



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO PROTEINOGRAMA SÉRICO DO ABUTRE-PRETO
(*Aegypius monachus*) E DO GRIFO (*Gyps fulvus*)**

ANDRÉ MIGUEL ABRANCHES BOTELHO DE ALMEIDA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José António Mestre Prates

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de
Sousa Jesus

Dr. Fernando González González

ORIENTADOR

Dr. Fernando González González

CO-ORIENTADOR

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de
Sousa Jesus

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO PROTEINOGRAMA SÉRICO DO ABUTRE-PRETO
(*Aegypius monachus*) E DO GRIFO (*Gyps fulvus*)**

ANDRÉ MIGUEL ABRANCHES BOTELHO DE ALMEIDA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José António Mestre Prates

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de
Sousa Jesus

Dr. Fernando González González

ORIENTADOR

Dr. Fernando González González

CO-ORIENTADOR

Doutora Sandra de Oliveira Tavares de
Sousa Jesus

2012

LISBOA

"A Natureza faz troça dos indivíduos. Desde que a grande máquina do universo vá girando, os ínfimos seres que a habitam não lhe interessam para nada!"

Voltaire

Para a minha Avó

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Fernando González González pela orientação, apoio e disponibilidade durante o período de estágio e durante a redação deste documento.

À minha co-orientadora, Prof. Doutora Sandra de Oliveira Tavares de Sousa Jesus por me ter aceite como seu orientando, pelos seus conselhos, pela sua compreensão e por todos ensinamentos que me transmitiu quer durante o curso, quer durante a redação desta dissertação.

À Prof. Doutora Carolyn Cray, da Universidade de Miami, pelo envio de artigos importantes sem os quais teria sido impossível redigir este documento.

A toda a equipa do GREFA, desde trabalhadores a voluntários, sem os quais teria sido impossível a realização deste estudo. À Márcia Viana por ter tornado possível o meu estágio, por todo o apoio prestado durante a realização do estudo e durante a redação desta dissertação. À Irene López pelos seus ensinamentos, disponibilidade e apoio incondicional. À Leyre e ao Javi por toda a ajuda que me deram no laboratório. À Liliana e à Filipa pela ajuda e pelas muitas horas que passaram comigo no laboratório. Ao Erick e à Nerea, meus companheiros de estágio, pela amizade, boa disposição e por terem tornado o meu estágio uma experiência única. Ao Nacho, Isabel, Sandra e David por tudo aquilo que me ensinaram e por me terem feito sentir verdadeiramente em casa.

A todos os meus amigos que partilharam este percurso comigo. À Lara pela companhia durante o estágio e por toda a ajuda que me deu nesta dissertação, ao Zé pelas palavras duras quando as precisava de ouvir e pela amizade incondicional, à Daniela por ser uma verdadeira amiga, à Teresa Neves por ser uma boa confidente e por me ter ajudado a ultrapassar os momentos mais difíceis, ao Ivo por ser a pessoa que é, ao Lança pela amizade e pelos momentos bem passados na Associação, à Teresa Duarte pela sua alegria, ao Rafa e ao Ricardo por toda a ajuda que me deram nesta dissertação e ao Dinis por me ter inculcido o gosto pela Fauna Silvestre e pela sua boa disposição.

Por último, um agradecimento especial à minha família. Ao meu pai pela amizade, apoio e paciência que teve para comigo durante este percurso. À minha mãe por toda a força que sempre me transmitiu. À minha irmã por ser um exemplo de perseverança e crer. À minha avó paterna por ser um exemplo a seguir e por ser responsável pelo Homem que sou hoje. Aos meus avós maternos por terem acreditado sempre em mim. Ao meu tio Chico por me ter sempre incentivado a ser melhor. À minha tia Duda por todo o amor e carinho.

CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DO PROTEINOGRAMA SÉRICO DO ABUTRE-PRETO (*Aegypius monachus*) E DO GRIFO (*Gyps fulvus*)

Resumo

O proteinograma é uma importante ferramenta auxiliar de diagnóstico que tem vindo a ser utilizada em Medicina Veterinária durante os últimos 20 anos. A sua utilização em aves selvagens apenas recentemente foi implementada, embora já tenha dado provas da sua utilidade. O principal objetivo deste trabalho foi obter os valores de proteínas totais e das suas diferentes frações eletroforéticas (albumina, α 1-globulinas, α 2-globulinas, β -globulinas e γ -globulinas) em indivíduos da espécie *Aegypius monachus* e da espécie *Gyps fulvus* e estudar a influência das variáveis sexo, idade e proveniência nos resultados obtidos na espécie *Aegypius monachus*, e ainda a influência das variáveis idade e proveniência nos resultados obtidos na espécie *Gyps fulvus*. Foi utilizada uma amostra de 10 indivíduos da espécie *Aegypius monachus* e uma amostra de 11 indivíduos da espécie *Gyps fulvus*. Recorreu-se à refratometria e ao método do biureto para determinar a concentração proteica e à eletroforese em acetato de celulose para realizar o fracionamento das proteínas séricas. Relativamente aos abutres-pretos e à influência do sexo na concentração sérica da proteína total e nos resultados eletroforéticos, os resultados sugeriram que as fêmeas desta espécie apresentam uma concentração proteica superior, bem como dos valores percentuais da albumina e das frações α 2, β , e γ das globulinas, pelo contrário a fração α 1 é superior nos machos. Já o A/G é semelhante nos dois sexos. Em relação à influência da idade nos resultados eletroforéticos desta espécie, os resultados sugeriram que aves adultas apresentam valores relativos de albumina e α 1-globulinas mais elevados que as aves juvenis, o A/G é também mais elevado nas aves adultas. Por outro lado, os animais juvenis apresentam valores percentuais de α 2-globulinas e γ -globulinas mais elevados que os animais adultos, não existindo diferenças nos valores relativos de β -globulinas entre animais de diferentes idades. Os resultados foram ainda sugestivos de existir um aumento no valor de proteínas totais com a idade. No que toca à proveniência dos animais, os resultados foram sugestivos de um aumento no A/G e nos valores percentuais de albumina e α 1-globulinas e, uma redução nos valores relativos das frações α 2, β e γ das globulinas e nos níveis de proteínas totais com o cativo. No que diz respeito à espécie grifo e à influência da idade e da proveniência nos parâmetros eletroforéticos, os resultados foram sugestivos de um aumento nos valores relativos das α 2 e β -globulinas e, uma redução no A/G, nos níveis de proteínas totais e nos valores percentuais de albumina, α 1 e γ -globulinas com a idade e com o cativo.

Palavras-chave: *Aegypius monachus*, *Gyps fulvus*, Sexo, Idade, Selvagem, Cativo, Proteinograma

PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF THE SERUM PROTEINOGRAM OF THE CINEREOUS VULTURE (*Aegypius monachus*) AND THE GRIFFON VULTURE (*Gyps fulvus*)

Abstract

Protein electrophoresis is an important diagnostics auxiliary tool that has been used by the Veterinarian Medicine for the last 20 years. The use of protein electrophoresis in wild birds has only recently been implemented, even though its usefulness has already been demonstrated. The main purpose of this paper was to obtain the values of the different electrophoretic fractions (albumin, α 1-globulins, α 2-globulins, β -globulins e γ -globulins) and the values of the total protein in individuals of the species *Aegypius monachus* and of the species *Gyps fulvus*, as well as to study the influence of the gender, age and origin on the results obtained from the species *Aegypius monachus* and to study the influence of the age and origin on the results obtained from the species *Gyps fulvus*. A sample of 10 subjects of the species *Aegypius monachus* and a sample of 11 subjects of the species *Gyps fulvus* was utilized in this study. Refractometry and the biuret method were used to determine the protein concentration and cellulose acetate electrophoresis was utilized to perform the fractionation of the serum proteins. Concerning the cinereous vultures and the influence of gender on the electrophoretic results and total protein the results have suggested that the females of this specie show a higher protein concentration, and a high percentage value of albumin and α 2, β , γ globulins fractions. On the contrary, the α 1 fraction is higher on the males of this specie. The A/G is similar on both genders. Regarding the influence of age on the electrophoretic results from this specie, the results have suggested that the adult birds present higher relative values of albumin and α 1-globulines than the juvenile birds. The A/G is also higher in adult birds. On the other hand, the juvenile birds show higher percentage values of α 2-globulins and γ -globulins than the adult birds. No differences were found on the relative values of β -globulins between animals of different ages. The results have also suggested that there is an increase of the total protein value with age. Regarding the animal origin, the results indicate that there is an increase on the A/G and on the albumin and α 1-globulins percentage values and a decrease on the relative values of the α 2, β and γ globulin fractions and on the total proteins levels on birds in captivity. As regard to the griffon vulture species and the influence of age on the electrophoretic parameters, the results have shown an increase on the relative values of the α 2 and β -globulins and a decrease on the A/G, on the total protein levels and on the percentage values of the albumin, α 1 and γ -globulins with age and captivity.

Key-words: *Aegypius monachus*, *Gyps fulvus*, Gender, Age, Wild, Captivity, Protein Electrophoresis

Índice geral

| | |
|--|-------------------------------------|
| Agradecimentos | iii |
| Resumo | v |
| Abstract | vii |
| Índice geral | ix |
| Índice de figuras | xiii |
| Índice de gráficos..... | xiv |
| Índice de tabelas..... | xvi |
| Abreviaturas, siglas e símbolos | xvii |
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| ESTÁGIO CURRICULAR | 3 |
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 6 |
| 1.1 Ecologia do Abutre-preto (<i>Aegypius monachus</i>) e do Grifo (<i>Gyps fulvus</i>)..... | 6 |
| 1.1.1 Caracterização da espécie | 6 |
| 1.1.1.1 Abutre-preto | 6 |
| 1.1.1.2 Grifo | 7 |
| 1.1.2 Distribuição mundial, com relevância para a Península Ibérica | 9 |
| 1.1.2.1 Abutre-preto | 9 |
| 1.1.2.2 Grifo | 10 |
| 1.1.3 Estatuto de conservação e proteção legal..... | 11 |
| 1.1.3.1 Abutre-preto | 11 |
| 1.1.3.2 Grifo | 11 |
| 1.2 Proteinograma | 11 |
| 1.2.1 Definição e importância..... | 11 |
| 1.2.2 Proteínas plasmáticas | 12 |
| 1.2.2.1 Métodos de determinação..... | Erro! Marcador não definido. |
| 1.2.2.1.1 Plasma vs soro | 15 |
| 1.2.2.1.2 Proteínas totais | 15 |

| | |
|--|----|
| 1.2.2.1.3 Fracionamento eletroforético das proteínas séricas | 17 |
| 1.2.2.2 Proteínas de fase aguda..... | 21 |
| 1.2.2.2.1 Resposta de fase aguda | 23 |
| 1.2.2.2.2 Proteína C reativa | 26 |
| 1.2.2.2.3 Haptoglobina..... | 27 |
| 1.2.2.2.4 Proteína amiloide A sérica | 28 |
| 1.2.2.2.5 α -1-glicoproteína ácida..... | 29 |
| 1.2.2.2.6 Transferrina-Ovotransferrina | 30 |
| 1.2.2.2.7 Ceruloplasmina | 32 |
| 1.2.2.2.8 Hemopexina..... | 32 |
| 1.2.2.2.9 Inibidores de peptidases | 33 |
| 1.2.2.2.10 Lectina de ligação à manose..... | 33 |
| 1.2.2.3 Proteínas de transporte..... | 34 |
| 1.2.2.3.1 Albumina..... | 34 |
| 1.2.2.3.2 Transtirretina..... | 35 |
| 1.2.2.4 Proteínas de coagulação..... | 37 |
| 1.2.2.4.1 Fibrinogénio | 37 |
| 1.2.2.5 Proteínas do complemento..... | 38 |
| 1.2.2.6 Imunoglobulinas | 38 |
| 1.2.2.6.1 Estrutura geral | 39 |
| 1.2.2.6.2 Ig M..... | 40 |
| 1.2.2.6.3 Ig Y (Ig G) | 41 |
| 1.2.2.6.4 Ig A | 42 |
| 1.3 Interpretação do proteinograma..... | 43 |
| 1.3.1 Eletroferograma normal nas aves..... | 43 |
| 1.3.2 Disproteinémias | 44 |
| 1.3.2.1 Hipoproteinémia | 44 |
| 1.3.2.2 Hiperproteinémia..... | 45 |
| 1.3.2.3 Aumento das α -globulinas..... | 45 |
| 1.3.2.4 Aumento das β -globulinas..... | 46 |
| 1.3.2.5 Aumento das α e β -globulinas..... | 47 |
| 1.3.2.6 Aumento das γ -globulinas | 47 |
| 1.3.2.7 Aumento das α e γ -globulinas | 48 |
| 1.3.2.8 Aumento das β e γ -globulinas | 48 |
| 1.3.2.9 Aumento das α , β e γ -globulinas e diminuição da albumina | 49 |
| 1.3.2.10 Aumento das γ -globulinas e diminuição da albumina..... | 50 |
| 1.3.3 Proteinograma em aves de rapina..... | 50 |
| 1.3.4 Influências fisiológicas no traçado eletroforético..... | 52 |

| | | |
|---------|---|----|
| 1.3.5 | Influências artefactuais no traçado eletroforético..... | 54 |
| 1.3.5.1 | Hemólise..... | 54 |
| 1.3.5.2 | Refrigeração, congelação e lipémia | 55 |
| 1.4 | Objetivos | 56 |
| 2. | MATERIAL E MÉTODOS | 56 |
| 2.1 | Amostra | 56 |
| 2.1.1 | Abutre-preto..... | 56 |
| 2.1.2 | Grifo..... | 56 |
| 2.2 | Colheita das amostras de sangue..... | 57 |
| 2.3 | Análises laboratoriais hematológicas..... | 58 |
| 2.4 | Análise laboratorial bioquímica | 58 |
| 2.5 | Proteinograma | 59 |
| 2.6 | Análise estatística..... | 60 |
| 3. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 61 |
| 3.1 | Proteinograma | 61 |
| 3.1.1 | Proteínas totais..... | 62 |
| 3.1.1.1 | Abutre-preto..... | 62 |
| 3.1.1.2 | Grifo..... | 65 |
| 3.1.1.3 | Abutre-preto e grifo | 67 |
| 3.1.2 | Albumina..... | 67 |
| 3.1.2.1 | Abutre-preto..... | 67 |
| 3.1.2.2 | Grifo..... | 69 |
| 3.1.2.3 | Abutre-preto e grifo | 70 |
| 3.1.3 | α 1-globulinas..... | 71 |
| 3.1.3.1 | Abutre-preto..... | 71 |
| 3.1.3.2 | Grifo..... | 72 |
| 3.1.3.3 | Abutre-preto e grifo | 73 |
| 3.1.4 | α 2-globulinas..... | 74 |
| 3.1.4.1 | Abutre-preto..... | 74 |
| 3.1.4.2 | Grifo..... | 75 |
| 3.1.4.3 | Abutre-preto e grifo | 76 |
| 3.1.5 | β -globulinas..... | 77 |
| 3.1.5.1 | Abutre-preto..... | 77 |
| 3.1.5.2 | Grifo..... | 78 |
| 3.1.5.3 | Abutre-preto e grifo | 79 |
| 3.1.6 | γ -globulinas..... | 80 |
| 3.1.6.1 | Abutre-preto..... | 80 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.1.6.2 | Grifo | 82 |
| 3.1.6.3 | Abutre-preto e grifo | 82 |
| 3.1.7 | Rácio Albumina/Globulinas | 83 |
| 3.1.7.1 | Abutre-preto | 83 |
| 3.1.7.2 | Grifo | 85 |
| 3.1.7.3 | Abutre-preto e grifo | 85 |
| 3.2 | Limitações do estudo | 86 |
| 4. | CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS | 87 |
| | Bibliografia | 89 |
| | Anexos..... | 104 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Abutre-preto | 8 |
| Figura 2. Grifo | 8 |
| Figura 3. Resposta de fase aguda | 26 |
| Figura 4. Traçado eletroforético normal de uma Cacatua (<i>Cacatua sp</i>) e de uma Caturra (<i>Nymphicus hollandicus</i>) | 44 |
| Figura 5. Nefrite aguda numa Arara (<i>Ara sp</i>)..... | 46 |
| Figura 6. Papagaio da Amazónia (<i>Amazona sp</i>) com aspergilose..... | 47 |
| Figura 7. Traçado eletroforético de clamidiose aguda e hepatite bacteriana numa Cacatua (<i>Cacatua sp</i>) | 49 |
| Figura 8. Traçado eletroforético de cirrose hepática num Papagaio da Amazónia (<i>Amazona sp</i>) e de peritonite ovo-induzida numa Ema (<i>Dromiceius novaehollandiae</i>) | 50 |
| Figura 9. Padrões eletroforéticos normais de um Falcão-peregrino (<i>Falco peregrinus</i>) e de uma Águia-de-cabeça-branca (<i>Haliaeetus leucocephalus</i>) | 52 |
| Figura 10. Traçado eletroforético de clamidiose aguda num Búteo-de-cauda-vermelha (<i>Buteo jamaicensis</i>) e de aspergilose num Bufo da Virgínia (<i>Bubo virginianus</i>) | 52 |
| Figura 11. Sistema eletroforético e local de aplicação da amostra | 60 |

Índice de gráficos

| | |
|--|----|
| Gráfico 1. Distribuição em classes dos animais admitidos, entre maio e novembro de 2011, no hospital do GREFA | 3 |
| Gráfico 2. Distribuição dos animais admitidos no hospital do GREFA, entre maio e novembro de 2011 (valor absoluto)..... | 4 |
| Gráfico 3. Causas de admissão no hospital do GREFA, entre maio e novembro de 2011 (valor absoluto) | 4 |
| Gráfico 4. Concentração sérica (g/dL) da proteína total nos abutres-pretos em função do sexo, idade e origem..... | 64 |
| Gráfico 5. Distribuição gráfica dos valores de PT determinados por refratometria e método do biureto..... | 65 |
| Gráfico 6. Concentração sérica (g/dL) da proteína total nos grifos em função da idade e origem..... | 66 |
| Gráfico 7. Concentração sérica (g/dL) da proteína total em função da espécie..... | 67 |
| Gráfico 8. Percentagem de albumina no soro nos abutres-pretos em função do sexo, idade e origem..... | 69 |
| Gráfico 9. Percentagem de albumina no soro nos grifos em função da idade e origem | 70 |
| Gráfico 10. Percentagem de albumina no soro em função da espécie..... | 70 |
| Gráfico 11. Percentagem das α 1-globulinas no soro nos abutres-pretos em função do sexo, idade e origem | 72 |
| Gráfico 12. Percentagem das α 1-globulinas no soro nos grifos em função da idade e origem | 73 |
| Gráfico 13. Percentagem das α 1-globulinas no soro em função da espécie | 73 |
| Gráfico 14. Percentagem das α 2-globulinas no soro nos abutres-pretos em função do sexo, idade e origem | 75 |
| Gráfico 15. Percentagem das α 2-globulinas no soro nos grifos em função da idade e origem | 76 |
| Gráfico 16. Percentagem das α 2-globulinas no soro em função da espécie | 76 |
| Gráfico 17. Percentagem das β -globulinas no soro nos abutres-pretos em função do sexo, idade e origem | 78 |
| Gráfico 18. Percentagem das β -globulinas no soro nos grifos em função da idade e origem | 79 |
| Gráfico 19. Percentagem das β -globulinas no soro em função da espécie | 79 |
| Gráfico 20. Percentagem das γ -globulinas no soro nos abutres-pretos em função do sexo, idade e origem | 81 |
| Gráfico 21. Percentagem das γ -globulinas no soro nos grifos em função da idade e origem | 82 |

| | |
|--|----|
| Gráfico 22. Percentagem das γ -globulinas no soro em função da espécie | 83 |
| Gráfico 23. Rácio albumina/globulinas nos abutres-pretos em função do sexo, idade e origem | 84 |
| Gráfico 24. Rácio albumina/globulinas nos grifos em função da idade e origem | 85 |
| Gráfico 25. Rácio albumina/globulinas em função da espécie | 86 |

Índice de tabelas

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Disposição das proteínas plasmáticas, de acordo com a sua mobilidade eletroforética | 14 |
| Tabela 2. Métodos de identificação de proteínas específicas | 17 |
| Tabela 3. Principais proteínas de fase aguda positivas e negativas em aves | 22 |
| Tabela 4. Valores de proteínas totais e frações proteicas obtidos nos abutres-pretos | 61 |
| Tabela 5. Valores de proteínas totais e frações proteicas obtidos nos grifos | 62 |
| Tabela 6. Características da espécie <i>Aegypius monachus</i> | 104 |
| Tabela 7. Características da espécie <i>Gyps fulvus</i> | 105 |
| Tabela 8. Valores de proteínas totais e frações proteicas obtidos em outros estudos realizados em aves | 106 |
| Tabela 9. Valores hematológicos obtidos para a amostra de abutres-pretos | 109 |
| Tabela 10. Valores hematológicos obtidos para a amostra de grifos | 110 |
| Tabela 11. Valores bioquímicos obtidos para a amostra de abutres-pretos | 111 |

Abreviaturas, siglas e símbolos

| | |
|---------------|---|
| ACTH | Hormona adrenocorticotrópica |
| A/G | Rácio albumina/globulinas |
| AGE | Eletroforese em gel de agarose |
| AGP | α -1-glicoproteína ácida |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| APP | Proteínas de fase aguda |
| APR | Resposta de fase aguda |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| CAE | Eletroforese em acetato de celulose |
| CK | Creatina cinase |
| cm | Centímetro |
| Cr | Ceruloplasmina |
| CRH | Hormona de libertação da corticotropina |
| CRP | Proteína C reativa |
| Da | Dalton |
| DC | Domínio constante |
| dL | Decilitro |
| DV | Domínio variável |
| EDTA | Ácido etilenodiamina tetra acético |
| ELISA | <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> |
| Fb | Fibrinogénio |
| g | Grama |
| GGT | Gama-glutamilttransferase |
| GREFA | <i>Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat</i> |
| h | Hora |
| Hb | Hemoglobina |
| HC | Cadeia pesada |
| HHA | Eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal |
| Hp | Haptoglobina |
| Hx | Hemopexina |
| IEF | Focalização isoeletrica |
| IFN- γ | Interferon gama |
| Ig | Imunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| kg | Quilograma |
| L | Litro |

| | |
|----------------|--|
| LC | Cadeia leve |
| LDH | Lactato desidrogenase |
| LPS | Lipopolissacárido |
| MBL | Lectina de ligação à manose |
| mg | Miligrama |
| MGF | Fator de crescimento mielomonocítico |
| min | Minuto |
| mmol | Milimole |
| MMP | Metaloproteínases de matriz |
| n | Número de indivíduos |
| Ovo-Tf | Ovotransferrina |
| PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida |
| pI | Ponto isoelétrico |
| PT | Proteínas totais |
| RBP | Proteína de ligação ao retinol |
| SAA | Proteína amiloide A sérica |
| SDS | Dodecilsulfato de sódio |
| Tf | Transferrina |
| TFG- β_2 | Fator de transformação do crescimento beta 2 |
| TRBC | Contagem total de eritrócitos |
| TTR | Transtirretina |
| TWBC | Contagem total de leucócitos |
| T3 | Triiodotironina |
| T4 | Tiroxina |

| | |
|-----------------|---------------|
| μL | Microlitro |
| μmol | Micromole |
| \bar{x} | Média |
| \tilde{x} | Mediana |
| σ | Desvio padrão |

INTRODUÇÃO

A presente dissertação de mestrado foi realizada no âmbito do Estágio Curricular realizado no *Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat* (GREFA, 40° 28'06.37 N, 3° 50'25.87 O), um centro de recuperação de Fauna Silvestre localizado na Comunidade de Madrid, Espanha.

O abutre-preto (*Aegypius monachus*) e o grifo (*Gyps fulvus*) são duas das espécies de aves de rapina mais emblemáticas do nosso país. Estas duas espécies, em particular o abutre-preto, sofreram uma importante regressão até à década de 1970. Desde então, as suas populações têm vindo a aumentar. No entanto, continuam a ser consideradas espécies em perigo, especialmente o abutre-preto. Por esta razão, é de capital importância conhecer as características bioquímicas, hematológicas e problemas comuns destas duas espécies, para que o Médico Veterinário especializado em Clínica de Fauna Silvestre tenha todas as ferramentas necessárias para a condução de programas de recuperação e reabilitação bem-sucedidos.

A análise bioquímica, da qual faz parte o proteinograma, em conjunto com a hematologia e o exame físico, constituem o pilar do diagnóstico clínico em qualquer espécie (Harr, 2006). Estes exames complementares de diagnóstico assumem especial importância nas aves, onde os sinais clínicos são frequentemente subtis e, nas quais um elevado número de diagnósticos (especialmente em aves selvagens) é realizado *post-mortem* por inexistência de dados clínico-patológicos em vida (Harr, 2006; Hochleithner, 1994).

Em medicina de conservação, de forma a reabilitar ou reproduzir espécies em perigo, especialmente no caso das aves de rapina, é fundamental conhecer os valores normais dos diversos parâmetros sanguíneos para cada espécie, de forma a permitir a deteção de alterações patológicas. É então aconselhável a avaliação dos perfis hematológicos e bioquímicos em todas as aves que se encontrem englobadas em projetos de reprodução em cativeiro e, quando possível, nas populações de espécies vulneráveis (Polo, Celdrán, Peinado, Viscor & Palomeque, 1992).

O presente trabalho é um estudo preliminar com o objetivo principal de contribuir para a caracterização do proteinograma sérico normal das espécies abutre-preto e grifo e, com o objetivo secundário de investigar a influência de algumas variáveis, nomeadamente o sexo, a idade e a proveniência no traçado eletroforético destas espécies. Pretende-se ainda determinar a fiabilidade da refratometria na determinação da concentração proteica total.

A estrutura da presente dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária divide-se em três partes. Na primeira é realizada uma breve descrição das atividades realizadas durante o período do estágio curricular. A segunda inclui uma revisão bibliográfica que incide sobre a ecologia do abutre-preto e do grifo, os métodos de determinação de proteínas, as alterações patológicas, fisiológicas e artefactuais do traçado eletroforético em aves, e onde é realizada ainda uma pequena descrição individual das principais proteínas. A

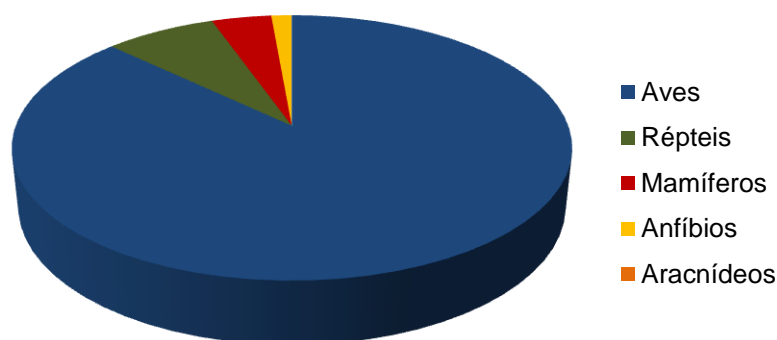
terceira parte engloba a componente experimental realizada, seus procedimentos, resultados e discussão, realizados de forma simultânea e conclusões.

ESTÁGIO CURRICULAR

Este estudo foi integrado num estágio curricular realizado entre os meses de maio e novembro de 2011 no Hospital de Fauna Silvestre do GREFA (40° 28'06.37 N, 3° 50'25.87 O) localizado em Majadahonda, na Comunidade de Madrid, Espanha. O estágio decorreu de segunda a domingo com um dia de descanso semanal. Foram efetuadas aproximadamente 72 horas semanais, perfazendo um total de 1728 horas ao fim dos seis meses em que decorreu o estágio.

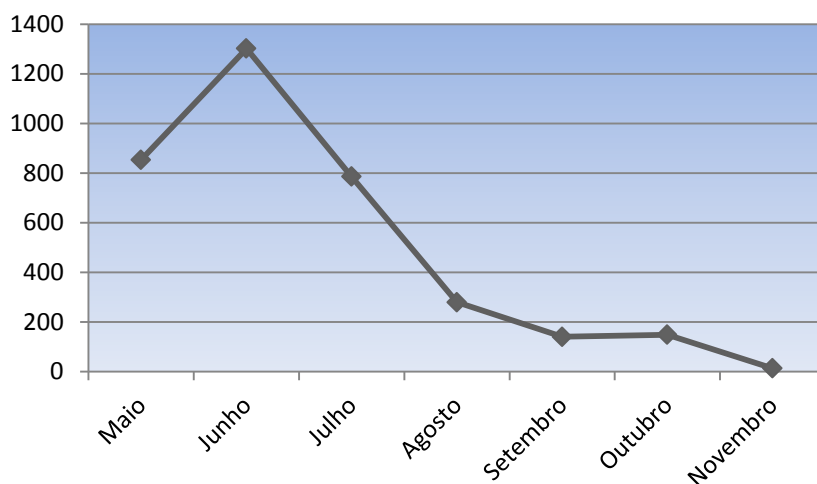
As atividades no hospital do GREFA encontravam-se organizadas de forma a permitir aos estagiários passar pelos diferentes sectores do hospital: enfermaria, necrópsias e laboratório. Durante o período de estágio foram assistidos um total de 3526 animais entre os quais aves, répteis, mamíferos, anfíbios e aracnídeos (Gráfico 1). Estes animais chegavam ao Centro de Recuperação trazidos pela equipa de resgate, por particulares ou ainda no âmbito de projetos de recuperação desenvolvidos pelo GREFA. A todos estes animais era efetuado um exame físico, e quando necessário, o respetivo tratamento.

Gráfico 1. Distribuição em classes dos animais admitidos, entre maio e novembro de 2011, no hospital do GREFA



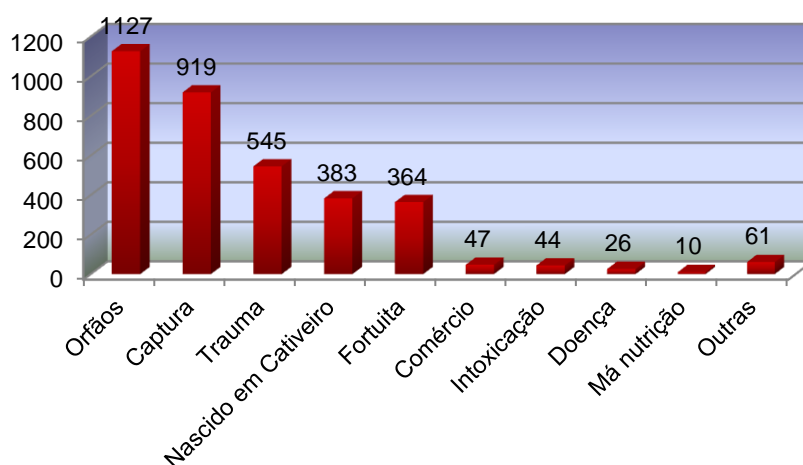
No GREFA, como na maioria dos centros de recuperação, a taxa de ingressos é fortemente sazonal, coincidindo a época de maior número de ingressos com o regresso dos animais da migração e com a época de reprodução (Gráfico 2).

Gráfico 2. Distribuição dos animais admitidos no hospital do GREFA, entre maio e novembro de 2011 (valor absoluto)



Durante o período de estágio a causa mais comum de ingresso no centro foi a entrada de crias por queda do ninho ou destruição do mesmo (1127), seguida da captura (direta, espoliação, armadilhas) e traumatismos (disparos, atropelamento, ataque por outros animais, electrocução, choque contra janela). Estiveram ainda na origem do ingresso no GREFA o nascimento em cativeiro, relacionado com os projetos de reprodução em cativeiro desenvolvidos no centro, causas fortuitas (animais encontrados em propriedades), o comércio (animais doados ou apreendidos), intoxicação, doença, má nutrição, entre outras (Gráfico 3).

Gráfico 3. Causas de admissão no hospital do GREFA, entre maio e novembro de 2011 (valor absoluto)



Durante o período em que decorreu o estágio foi-me dada a oportunidade de auxiliar no trabalho desenvolvido no hospital do GREFA, de assistir e participar em cirurgias, predominantemente de carácter ortopédico, realizar necrópsias e ainda trabalhar no laboratório do centro nas áreas de hematologia, parasitologia e microbiologia.

Adicionalmente, tive a oportunidade de participar e colaborar com os departamentos de reprodução em cativeiro e reabilitação e em projetos de censos e anilhagem levados a cabo pelo centro.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Ecologia do Abutre-preto (*Aegypius monachus*) e do Grifo (*Gyps fulvus*)

O Abutre-preto e o Grifo são duas das espécies de aves da Família *Accipitridae*, pertencentes à Ordem Accipitriformes que residem na Península Ibérica tendo aqui estabelecido importantes colónias (ICNB, 2006a; ICNB, 2006b). No tópico que se segue irá ser feita uma breve caracterização das duas espécies (Tabela 6 – Anexo I e Tabela 7 – Anexo II) focando temas como anatomia, alimentação, reprodução e habitat. Posteriormente é realizada uma revisão bibliográfica da sua distribuição a nível mundial, em particular na Península Ibérica, e do seu estatuto de conservação atual.

1.1.1 Caracterização da espécie

1.1.1.1 Abutre-preto

O abutre-preto (Figura 1) é a maior ave de rapina do Paleártico, podendo atingir cerca de 3 metros de envergadura e 10 kg de peso (Priorimancha, 2012). Apresenta uma plumagem de cor preto-acastanhada, sendo a cabeça desprovida de penas e coberta por uma penugem creme clara. A cabeça apresenta ainda manchas mais escuras de dimensão variável (Del Hoyo, Elliott & Sargatal, 1994). As penas do pescoço formam uma espécie de “gola” que é característica desta espécie (Priorimancha, 2012). Possuem um bico de grandes dimensões de cor escura e com a cera cinzento-azulada. As patas são cinzentas (Del Hoyo *et al.*, 1994). Os jovens desta espécie de forma geral apresentam uma plumagem mais escura, com a cabeça totalmente coberta por uma penugem negra. Não existe dimorfismo sexual nesta espécie (Priorimancha, 2012).

Os indivíduos desta espécie constroem os seus ninhos preferencialmente em árvores localizadas entre os 200 e os 1600 metros de altitude. A nidificação ocorre em florestas mediterrâneas de sobreiros (*Quercus suber*) e azinheiras (*Quercus rotundifolia*), florestas alpinas e subalpinas de coníferas (*Pinus sylvestris* y *P. nigra*), florestas mediterrâneas montanhosas de coníferas (*P. pinaster*), prados e em falésias, com vegetação, da costa mediterrânea (Artés, 2004).

O habitat de alimentação inclui zonas vastas de ceralicultura e pastoreio extensivo e, ainda, zonas de mato não muito denso (ICNB, 2008a). O abutre-preto evita povoamentos florestais densos, bem como a costa litoral e áreas muito exploradas pelo homem. Fora da época de nidificação a dormida é geralmente comunal, em grandes árvores, ocasionalmente na companhia do grifo. Os casais passam frequentemente a noite nos ninhos, mesmo fora do período reprodutor. Podem ainda pernoitar em rochas ou em árvores próximas do local onde se estiveram a alimentar, para continuar a refeição na manhã seguinte (ICNB, 2006a).

O abutre-preto é uma espécie quase exclusivamente necrófaga, alimentando-se de carcaças de médio e grande porte (Birdlife International, 1996). A dieta desta espécie é

variada, podendo incluir carcaças de ovinos, caprinos, bovinos, equinos, lagomorfos e cervídeos, embora consumam preferencialmente ovelhas, cabras e coelhos (Artés, 2004). Excepcionalmente podem capturar presas vivas, como lagartos, tartarugas ou coelhos, tratando-se normalmente de animais pequenos ou doentes. Alimenta-se sozinho ou em pequenos grupos, podendo regressar à mesma carcaça durante vários dias (ICNB, 2006a). Esta espécie atinge a maturidade sexual por volta dos 4-6 anos, sendo que pode nidificar sozinha ou em colónias desorganizadas (Artés, 2004; Birdlife International, 1996). Como referido anteriormente edifica os ninhos no topo de árvores, sendo estes geralmente reutilizados em anos sucessivos. É uma espécie monogâmica, cuja relação entre os membros do casal é de longa duração podendo mesmo ser para toda a vida (ICNB, 2006a). A fêmea normalmente só põe um ovo por ano, sendo que a responsabilidade de incubação do ovo, defesa do ninho e alimentação da cria é partilhada pelos dois membros do casal. O ciclo reprodutor inicia-se em Janeiro com a realização dos voos nupciais e a construção ou melhoria dos ninhos. Entre Fevereiro e Março ocorre a ovopostura, e o período de incubação varia entre os 50 e 55 dias. A cria nasce normalmente em Abril-Maio e permanece no ninho cerca de 120 dias. Já a voar, a cria de abutre-preto pode frequentar o ninho até ao fim de Novembro. A longevidade dos membros desta espécie é de 35-40 anos ou mais (Artés, 2004; Birdlife International, 1996).

1.1.1.2 Grifo

O grifo (Figura 2) é uma das aves de rapina de maior envergadura da Península Ibérica. Apresenta 7-11 kg de peso e pode atingir os 280 cm de envergadura. Trata-se de uma espécie gregária e sedentária, embora os juvenis possam dispersar percorrendo grandes distâncias (Ocaña, 2012). A plumagem é de cor canela na região do dorso, ventre e porção anterior das asas. As rémiges primárias e secundárias e as tétrizes são castanhas escuras. A cabeça e o pescoço, que é bastante longo, encontram-se cobertos por uma penugem de cor branca. Na base do pescoço possui um característico colar de penas. O bico é castanho no centro, com a base e a ponta amareladas. As patas são de cor cinza chumbo (Plana, 2012). Nos juvenis o colar na base do pescoço é menos proeminente e é constituído por penugem. Não existe um dimorfismo sexual acentuado. As fêmeas são ligeiramente maiores que os machos (Ocaña, 2012).

O grifo pode ser encontrado numa grande variedade de zonas abertas com poucas ou nenhuma árvores, em planícies, montanhas ou planaltos montanhosos, evitando florestas e áreas com vegetação densa, zonas húmidas, lagos, estuários ou zonas marinhas (ICNB, 2006b). Em Portugal o seu habitat de nidificação corresponde exclusivamente a escarpas rochosas de grande dimensão, associadas a barrancos fluviais ou cristas montanhosas. Faz o ninho em saliências ou pequenas cavernas nas escarpas, sendo os ninhos de anos anteriores geralmente reutilizados em anos sucessivos. No nosso país, o habitat de

alimentação do grifo corresponde a campos desarborizados, ou com árvores esparsas, que são aproveitados para pecuária e cerealicultura extensiva, bem como montados de sobro e azinho. Procura frequentemente nascentes, regatos e charcas para se banhar e beber água (ICNB, 2008b). Na dormida é comunal e noturno em grupos desagregados, usualmente em saliências, em escarpas ou em afloramentos rochosos. O local de dormida coincide muitas vezes com o local das colónias em nidificação. Pode também situar-se temporariamente próximo do local de alimentação. Pode formar dormitórios em árvores, em regra localizados em zonas com elevada disponibilidade de cadáveres (ICNB, 2008b).

Trata-se de uma espécie necrófaga, alimentando-se de tecidos moles (músculos e vísceras) de mamíferos de médio e grande porte em decomposição. As principais fontes de alimento são as raposas, os javalis, os cervos, as cabras e as ovelhas (Ocaña, 2012; ICNB, 2006b). Pode realizar movimentos migratórios em grupos para procurar comida. Possivelmente utiliza uma área de busca maior do que os outros abutres europeus. A deteção dos cadáveres é realizada através da sua apurada visão e pelos movimentos dos outros animais, no solo ou no ar (ICNB, 2006b).

O grifo cria pela primeira vez com cerca de 4 ou 5 anos de idade. A cria é realizada de forma colonial, embora ninhos isolados possam ocorrer. O ciclo reprodutivo inicia-se em Dezembro com os voos pré-nupciais, sendo o ninho construído pelos dois progenitores (Ocaña, 2012). A postura do ovo (normalmente único) ocorre entre o final de Dezembro e o final de Janeiro, a incubação, que dura cerca de 47 a 57 dias está a cargo de ambos os progenitores. A cria normalmente nasce em Fevereiro-Março, sendo alimentada pelos dois reprodutores por regurgitação. Embora possa voar a partir dos 90 dias a cria permanece no ninho cerca de 113 a 159 dias, de forma a completar a aprendizagem com os progenitores. Entre Julho e Agosto a cria abandona o ninho, iniciando uma vida errática. Esta espécie pode viver cerca de 37 anos, sendo que em cativeiro podem atingir os 55 anos (European Raptors Biology and Conservation, 2012; Plana, 2012).

Figura 1. Abutre-preto



Figura 2. Grifo



1.1.2 Distribuição mundial, com relevância para a Península Ibérica

1.1.2.1 Abutre-preto

O abutre-preto apresenta atualmente uma distribuição no Paleártico Ocidental muito reduzida, comparativamente ao que se passava no século XIX, compreendendo apenas a população ibérica, que está praticamente isolada, e as populações do noroeste da Grécia, Crimeia, Bulgária, Ucrânia, Geórgia, Arménia, Azerbaijão, no leste europeu. No sul de França, depois da sua extinção há cerca de 100 anos, a espécie foi reintroduzida com sucesso nas décadas de 1990 e 2000. Esta espécie pode ainda ser encontrada na Rússia, Turquia, Irão, Afeganistão, norte da Índia, China, Mongólia e sul da Sibéria. No inverno as populações orientais visitam o Sudão, a região oriental do Paquistão e a região noroeste da Coreia (Artés, 2004; ICNB, 2008a).

Na Europa a espécie sofreu uma importante regressão até à década de 1970, extinguindo-se em grande parte do continente. Os principais fatores que estiveram relacionados com esta regressão foram a perda de habitat, a perseguição direta da espécie pelos humanos, envenenamentos e mudanças no manejo dos efetivos pecuários (estabulação). A sua população e área de distribuição ficaram confinadas à Península Ibérica e ilha de Maiorca, no oeste, e aos Balcãs, países transcaucásicos (Geórgia, Arménia e Azerbaijão) e Península da Crimeia, no este. No conjunto da parte europeia da Rússia, Ucrânia e países transcaucásicos estima-se que exista uma população de 180-200 casais, na Grécia 21 casais e entre 100 a 500 indivíduos na Turquia. Em França existem 8 casais no Maciço Central (Cévennes). No que diz respeito à população asiática existe pouca informação tendo sido contabilizados 90 casais na República de Tuva e 800 indivíduos na Ásia Central. Na China foram contabilizados pelo menos 1760 casais (Artés, 2004; Birdlife International, 1996).

Em Espanha, a população de abutres-pretos encontra-se distribuída pelo quadrante sudoeste e pela zona norte das Baleares, tendo tido uma evolução claramente favorável desde a década de 1980. No primeiro censo nacional realizado em 1973 foi contabilizada uma população de 190 casais distribuídos por 15 áreas de reprodução. Em 1986 quando foi realizado o segundo censo nacional foram contabilizados 365 casais, que se encontravam distribuídos por 17 colónias. O terceiro censo nacional realizado em 1989 relatou a existência de 774 casais distribuídos por 27 colónias. Em 1993 foram contabilizados 1027 casais, distribuídos por 33 colónias ou pequenos núcleos de reprodução. Em 2000 a população espanhola estimava-se em 1031 casais, e em 2001 em 1334 casais (Artés, 2004). No último censo nacional realizado em 2006, foram contabilizados 1845 casais, 5 dos quais encontravam-se isolados, estando os restantes distribuídos por 35 colónias (De la Puente, Moreno-Opo & Del Moral, 2007).

Em Portugal, a sua área de ocorrência regular restringe-se a uma estreita faixa na zona fronteiriça do Alentejo e Beira Baixa, que se estende, no máximo, até 30-40 km para o

interior (ICNB, 2008a) É um visitante esporádico na região do douro internacional (ICNB, 2006a). De acordo com as observações de campo, o número de indivíduos que regularmente frequentam o território nacional tem vindo a crescer, sendo de crer que se aproxima da centena. Enquanto população nidificante, não existem registos de nidificação comprovada de abutre-preto em Portugal desde 1973. Todavia, como resultado do aumento populacional desta espécie que se tem verificado em Espanha e também de algumas ações levadas a efeito no nosso país visando a sua fixação em território nacional, ocorreram tentativas de nidificação em duas plataformas em 1996, embora em nenhum dos casos tenha tido êxito. Desde essa altura, ocorreram novas tentativas de nidificação (1998, 2002 e 2003), porém nenhuma delas foi bem sucedida (ICNB, 2006a; ICNB, 2008a).

1.1.2.2 Grifo

O grifo é uma espécie com uma distribuição essencialmente paleártica. Na Europa nidifica na Albânia, Bulgária, Espanha (incluindo as Ilhas Canárias), França, Grécia, Itália, Moldávia, Portugal, Roménia, Rússia, Turquia e Ucrânia. Fora da Europa nidifica ainda na região montanhosa de Marrocos e Península Arábica (ICNB, 2006b; ICNB, 2008b).

Em Espanha, a população de grifos encontra-se distribuída por 14 comunidades que incluem: a Extremadura, a Catalunha, o País Basco, La Rioja, Cantábria, Madrid, Comunidade Valenciana, Astúrias, Múrcia, Castela e Leão, Aragão, Andaluzia, Navarra e Castela-Mancha. As últimas 5 comunidades concentram 78 % da população de grifos de toda a Espanha. No último censo nacional realizado em 2008 em Espanha, foram contabilizados 24609-25541 casais distribuídos por 1560 colónias (Del Moral, 2009).

No nosso país, a maioria da população nidificante encontra-se confinada aos vales alcantilados do Douro e Tejo superiores e seus afluentes. Existem ainda alguns casais nas cristas quartzíticas serranas da região de Vila Velha de Ródão, Proença-a-Nova, Serra de Penha Garcia e Serra de S. Mamede. As aves não reprodutoras ocupam uma região mais vasta, onde aparentemente existe alimento, nomeadamente na região de Castro Verde e em toda a faixa fronteiriça desde Barrancos até Montesinho (ICNB, 2008b). Segundo o último censo da espécie realizado em 1999, esta possui um total de 262-272 casais nidificantes que se distribuem por 31 colónias e 14 casais isolados, o que representa menos de 3 % do efetivo existente na Península Ibérica (ICNB, 2006b). Comparativamente ao censo anterior realizado em 1989 verificou-se um claro aumento populacional, acompanhado de uma ampliação da sua área de distribuição. De 1999 em diante, o incremento e expansão da espécie abrandaram, mantendo-se a população relativamente estável desde então (ICNB, 2008b).

1.1.3 Estatuto de conservação e proteção legal

1.1.3.1 Abutre-preto

É uma espécie globalmente classificada como Quase Ameaçada (NT) pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN, 2004). Na BirdLife International (2004) o abutre-preto é classificado como espécie com estatuto de conservação desfavorável (SPEC1), estando a espécie ameaçada a nível global. A nível nacional foi classificada como Criticamente em Perigo (CR), dado que é uma espécie com população extremamente reduzida (inferior a 6 indivíduos adultos maturos) (ICNB, 2008a). Em Espanha o estatuto de conservação do abutre-preto é de espécie Vulnerável (VU) (Artés, 2004).

Esta espécie encontra-se protegida legalmente por Convenções Internacionais assinadas por Portugal, nomeadamente a Convenção sobre a conservação das espécies migradoras pertencentes à fauna selvagem (Convenção de Bona), estando incluída no anexo II do Decreto-Lei n.º 103/80 de 11 de Outubro, a Convenção relativa à proteção da vida selvagem e dos ambientes naturais na Europa (Convenção de Berna), estando incluída no anexo II do Decreto-Lei n.º 316/89 de 22 de Setembro, e a Convenção sobre o comércio internacional nas espécies da fauna e flora selvagens ameaçadas de extinção (Convenção de Washington), estando incluída no anexo II-A do Decreto-Lei n.º 114/90 de 5 de Abril. Para além disso está ainda incluída no anexo I da Diretiva Comunitária n.º 79/409/CEE, do Conselho, de 2 de Abril (Diretiva Aves), do Decreto-Lei n.º 140/99 de 24 de Abril, alterado pelo Decreto-Lei n.º 49/2005 de 24 de Fevereiro. Esta Diretiva Comunitária foi alterada pelas Diretivas n.ºs 91/244/CEE, da Comissão, de 6 de Março, 94/24/CE, do Conselho, de 8 de Junho, e 97/49/CE, da Comissão, de 29 de Junho.

1.1.3.2 Grifo

O estatuto de conservação global do grifo foi considerado pouco preocupante pela IUCN (IUCN, 2004). Na BirdLife International (2004) o grifo é classificado como espécie com estatuto de conservação favorável, não concentrada na europa (Não SPEC). Em Espanha o estatuto de conservação foi classificado como Pouco Preocupante (LC) (Artés, 2004). Em Portugal esta espécie foi classificada como Quase Ameaçada (NT), dado ser uma espécie com população reduzida (inferior a 1000 indivíduos maturos) (ICNB, 2008b).

Esta espécie encontra-se protegida pela mesma legislação referida anteriormente para o abutre-preto.

1.2 Proteinograma

1.2.1 Definição e importância

O proteinograma corresponde à separação e posterior identificação e quantificação de forma relativa das proteínas plasmáticas ou séricas através da aplicação de um campo elétrico (eletroforese). Esta técnica permite quantificar as concentrações proteicas de albumina e

globulinas, um grupo de proteínas de natureza variada que migram em diferentes grupos (α_1 , α_2 , β e γ -globulinas) (Eckersall, 2008; Harris, 2000).

Durante os últimos 40 anos, a eletroforese proteica tem sido utilizada como uma técnica auxiliar de diagnóstico de rotina em medicina humana, contribuindo em larga escala para o diagnóstico definitivo. Em medicina veterinária, mais especificamente em clínica de animais de companhia, esta técnica tem vindo a ser utilizada, durante os últimos 20 anos, como uma ferramenta na investigação de algumas doenças, entre as quais se destacam a peritonite infecciosa felina, a erliquiose, o mieloma, a amiloidose, entre outras. Em medicina aviária a sua utilização tem crescido durante os últimos 15 anos, tendo sido objeto de algumas publicações (Cray & Tatum, 1998; Tatum, Zaias, Mealey, Cray & Bossart, 2000).

No campo da medicina aviária, a análise das proteínas plasmáticas constitui uma importante ferramenta auxiliar tanto na determinação do estado de higidez aviária, como no diagnóstico de doenças cardíacas, hepáticas, gastrointestinais e infecciosas, é também fundamental na determinação do curso dos processos (se são agudos ou crónicos) (Lumeij, 2008; Rosenthal, 2000). No entanto, é importante ter presente que a determinação de proteínas plasmáticas raramente conduz a um diagnóstico definitivo, sendo necessária a sua interpretação em conjunto com a anamnese, exame físico, análises bioquímicas, hematológicas e testes serológicos (Lumeij, 2008).

O proteinograma tem ainda importância no estabelecimento do prognóstico e na monitorização do tratamento (Tatum *et al.*, 2000). É de salientar que resultados eletroforéticos anormais podem ser observados em cerca de 30 % de aves aparentemente saudáveis que não apresentaram alterações, ou que apresentaram apenas alterações ligeiras nos testes de diagnóstico de rotina (Cray & Tatum, 1998).

Até ao momento, as aves que têm sido objeto de um estudo mais aprofundado e que apresentam padrões eletroforéticos bem definidos, são os psitacídeos e a ordem dos galiformes. Contudo as outras aves parecem apresentar valores distintos, por exemplo as aves de rapina nos estudos realizados até ao momento, aparentam apresentar valores mais elevados nas α_1 , α_2 , e β -globulinas relativamente aos valores apresentados pelos psitacídeos. É então necessária a determinação dos valores normais e variações fisiológicas do padrão eletroforético nas diferentes espécies de modo a que o proteinograma se possa tornar uma ferramenta importante no diagnóstico de doenças nas aves de rapina (Cray & Tatum, 1998; Cray, Rodriguez & Zaias, 2007; Lanzarot, Montesinos, San Andrés, Rodríguez & Barahona, 2001).

1.2.2 Proteínas plasmáticas

As proteínas plasmáticas são um dos grupos mais importantes de moléculas, sendo essenciais para a fisiologia normal dos animais. Com o desenvolvimento de diversas técnicas de eletroforese, nos últimos 70 anos, vários estudos quantificaram e caracterizaram

estas proteínas (Cray & Tatum, 1998). Atualmente, devido aos recentes desenvolvimentos tecnológicos e número crescente de testes comercialmente disponíveis, os laboratórios conseguem medir uma grande variedade de proteínas específicas e utilizam diversos sistemas analíticos para o reconhecimento de padrões proteicos (Cray & Tatum, 1998; Watterson, 2009).

A síntese e secreção da maioria das proteínas plasmáticas, com exceção das imunoglobulinas, são realizadas pelos hepatócitos no fígado (Eckersall, 2008). As mesmas são influenciadas e controladas pelo estado nutricional, mecanismos de retroalimentação, fatores genéticos e hormonais (Watterson, 2009).

A secreção da albumina, por exemplo, é estimulada por uma descida na pressão oncótica, podendo também ser afetada por alterações fisiopatológicas, nomeadamente doenças infecciosas ou inflamatórias, que originam uma diminuição da sua secreção. Esta redução advém da ação de citocinas pró-inflamatórias, como são o caso das interleucinas (IL), nomeadamente a IL-1, IL-6 e o fator de crescimento mielomonocítico (MGF). Estas citocinas são simultaneamente responsáveis pelo aumento da síntese e secreção das proteínas de fase aguda (APP) (Eckersall, 2008; Gruys, Toussaint, Niewold & Koopmans, 2005b; Mazur-Gonkowska, Koncicki & Krasnodebska-Depta, 2004).

As imunoglobulinas são produzidas pelos plasmócitos de uma grande variedade de órgãos, entre os quais se destacam a bolsa de Fabricius e o baço, no seguimento da estimulação pela presença de antígenos em circulação ou nos tecidos (Eckersall, 2008; Glick, 1999).

As massas moleculares das proteínas plasmáticas podem atingir valores na ordem dos 2750 Da, no caso das β -lipoproteínas, ao passo que as suas concentrações podem variar dos milimoles por litro, como é o caso da albumina, até os femtomoles por litro em algumas proteínas. A dimensão molecular das diferentes proteínas é um fator importante quer na sua distribuição, quer no seu transporte através dos mecanismos ativos e passivos do organismo. Deste modo, existem algumas proteínas que se movem livremente nos espaços extracelulares e intravasculares, enquanto outras são intracelulares sendo libertadas apenas quando ocorrem danos celulares (Watterson, 2009). As proteínas plasmáticas mais importantes encontram-se agrupadas na Tabela 1.

As proteínas exercem uma grande variedade de funções no plasma. Atuam coletivamente na manutenção da pressão osmótica coloidal, auxiliando na manutenção da homeostase acidobásica e possuem também uma função nutritiva. Individualmente atuam na coagulação sanguínea (fibrinogénio), nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra patógenos (imunoglobulinas, complemento), no transporte de metabolitos (transferrina, albumina), na regulação do metabolismo celular (hormonas), na prevenção de proteólise (α -1-antitripsina), e ainda na provisão de aminoácidos em situações de desnutrição (albumina).

Com base nas suas funções metabólicas, as proteínas podem também ser agrupadas em diferentes categorias, nomeadamente: proteínas de fase aguda, imunoproteínas, proteínas

do complemento, proteínas de coagulação e proteínas de transporte (Eckersall, 2008; Watterson, 2009).

As concentrações das proteínas plasmáticas são parâmetros dinâmicos que dependem da biossíntese, da distribuição dos fluidos nos compartimentos intravasculares e extravasculares e ainda da eliminação (degradação, catabolismo e perda) das proteínas (Watterson, 2009).

Tabela 1. Disposição das proteínas plasmáticas, de acordo com a sua mobilidade eletroforética

| |
|--|
| Transtirretina |
| Albumina |
| α1-globulinas |
| Transcortina |
| α 1-glicoproteína ácida |
| α 1-antitripsina |
| α 1-antiquimiotripsina |
| α 1-lipoproteínas |
| α2-globulinas |
| Ceruloplasmina |
| Haptoglobina |
| α 2-lipoproteínas |
| β-globulinas |
| Proteína C reativa |
| Proteína amiloide A sérica |
| Componentes do complemento (C3 e C4) |
| Transferrina |
| Ferritina |
| Hemopexina |
| β -lipoproteínas |
| Fibrinogénio |
| γ-globulinas |
| Imunoglobulinas |

1.2.2.1 Métodos de determinação

1.2.2.1.1 Plasma vs soro

Os dois tipos de amostra normalmente utilizados para as análises bioquímicas são o plasma e o soro. O plasma é o sobrenadante obtido quando uma amostra de sangue, colhida com anticoagulante, é centrifugada. O plasma contém todas as proteínas existentes na Tabela 1. O soro é a porção líquida remanescente após ter-se dado a coagulação, que necessita da conversão do fibrinogénio (Fb) em fibrina. Quando a recolha da amostra sanguínea ocorre sem a utilização de um anticoagulante, a coagulação subsequente na amostra resulta na conversão do Fb em fibrina. Deste modo, o soro é desprovido de Fb, contendo albumina e as restantes globulinas (Eckersall, 2008; Lassen, 2006).

Diversos autores defendem a utilização de plasma nos ensaios eletroforéticos realizados em aves. Este facto está relacionado com a ausência de Fb do soro. Esta APP é considerada uma das proteínas mais importantes da fração β , estando demonstrado o seu aumento em alguns processos inflamatórios e/ou infecciosos, logo a utilização do soro poderá tornar difícil evidenciar tais processos (Rosenthal, 2000). Outra justificação para utilização de plasma em detrimento do soro em aves é o risco de coagulação do sobrenadante, quando existe um intervalo de tempo demasiado grande entre a colheita e a separação do soro das células. Outro motivo ainda é a possibilidade de recolher maior quantidade de plasma do que de soro. Em pombos a concentração de proteínas totais é cerca de 1.5 g/L maior no plasma do que no soro, devido à presença de Fb no primeiro (Lumeij, 2008).

1.2.2.1.2 Proteínas totais (PT)

a. Métodos químicos

i. Método do biureto

Na reação do biureto, as proteínas formam complexos com o cobre em meio alcalino. Estes complexos, que estão dependentes da presença de ligações peptídicas, são de cor azul-violeta. O método do biureto é extremamente preciso para a gama de concentrações de PT encontradas normalmente no soro (1 a 10 g/dL), não sendo contudo suficientemente sensível para as concentrações proteicas encontradas noutros fluidos corporais, como é o caso do líquido cefalorraquidiano (Eckersall, 2008). O método do biureto é o método de eleição para a determinação da concentração das proteínas plasmáticas ou séricas nas aves (Campbell, 2006; Lumeij, de Bruijne & Kwant, 1990).

ii. *Métodos de precipitação*

As proteínas em solução são sensíveis a alterações do pH no meio envolvente, que conduzem a mudanças na ionização das cadeias laterais dos aminoácidos ácidos e básicos. A alteração da ionização provoca a distorção das forças electrostáticas existentes entre os resíduos, que mantêm a conformação nativa da proteína. A alteração do pH, especialmente quando levada ao extremo, origina a rutura das estruturas terciárias e quaternárias das proteínas provocando uma diminuição da solubilidade e, por consequência, a precipitação das proteínas a partir da solução. Alguns reagentes, como é o caso dos ácidos sulfossalicílico e túngstico, provocam a precipitação das proteínas e são utilizados para quantificar a concentração de proteínas nos fluidos biológicos quando esta se encontra entre os 0,1 e 1 g/dL (Eckersall, 2008).

iii. *Métodos químicos sensíveis*

A determinação da concentração proteica em fluidos que apresentam níveis de PT inferiores a 0,1 g/dL requerem métodos de determinação mais sensíveis. Entre estes métodos encontram-se o método de Lowry (Lowry, Rosebrough & Randall, 1951), método de eleição para avaliar baixas concentrações proteicas durante diversos anos; o método de Smith (Smith *et al.*, 1985) e o método de Bradford (Bradford, 1976). Estes métodos dependem de reações que ocorrem entre reagentes e aminoácidos específicos existentes nas proteínas, como é o caso da reação que ocorre entre o reagente de Folin-Ciocalteu e o grupo fenólico dos aminoácidos aromáticos triptofano e tirosina que produz um cromogéneo azul (método de Lowry) (Eckersall, 2008).

b. *Métodos físicos*

i. *Refratometria*

A luz é refratada, quando passa do ar para o líquido. Se o líquido contém proteínas dissolvidas, o grau de refração (índice de refração) sofre uma alteração que é proporcional à concentração de proteínas. A utilização do refratómetro possibilita a determinação rápida deste índice de refração permitindo determinar a concentração de PT (Eckersall, 2008).

A refratometria, ao contrário do que acontece nos mamíferos, apresenta pouca fiabilidade nas aves (Lumeij & de Bruijne, 1985). É nesta classe que se encontram as maiores inconsistências entre a refratometria e o método do biureto e a eletroforese. A razão desta inconsistência está relacionada com o facto de que um aumento na fração sólida não proteica aumenta também facciosamente a medição refratométrica da fração proteica. Os compostos normalmente responsáveis por estes valores erróneos são o colesterol, a ureia, as lipoproteínas e a glucose (George, 2001).

McSherry e Al-Baker (1976) demonstraram através de estudos *in vitro* que a hiperglicemia e a uremia aumentavam falsamente a concentração de proteínas plasmática medidas por

refratometria, em cerca de 0,4 até 0,5 g/dL. Dubin e Hunt (1978) descobriram que a adição de 500 ou 1000 mg/dL de dextrose a amostras sanguíneas de cães provocava um falso aumento na concentração, de proteínas plasmáticas medidas por refratometria. Neste mesmo estudo foi comprovado ainda que o excesso de ácido etilenodiamina tetra acético (EDTA) em amostras sanguíneas era também responsável pelo falso aumento das proteínas plasmáticas. Noutro estudo, realizado por Cray, Rodriguez e Arheart (2008) foi demonstrado existir uma correlação significativa entre o colesterol e as PT em psitacídeos, sendo o colesterol o responsável pelos valores ligeiramente mais elevados das proteínas plasmáticas obtidos pelo método do refratômetro quando comparados com o método do biureto. Sutton (1976) determinou que a hiperbilirrubinemia e a hemólise não interferem com a determinação da concentração proteica por refratometria.

A refratometria deve ser encarada como uma alternativa rápida, embora pouco exata, para determinar a concentração de proteínas plasmática. Sendo aconselhável, sempre que possível, realizar esta determinação através do método do biureto ou eletroforese (Campbell, 2006; George, 2001).

1.2.2.1.3 Fracionamento eletroforético das proteínas séricas

A eletroforese é o método de eleição para a separação analítica de proteínas. Neste capítulo serão descritas as principais técnicas eletroforéticas utilizadas para a separação de proteínas séricas. Uma vez que não se trata do objetivo desta dissertação, os métodos de identificação de proteínas específicas não serão descritos, encontrando-se agrupados na Tabela 2.

Tabela 2. Métodos de identificação de proteínas específicas

| |
|--|
| <i>Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)</i> |
| Imunodifusão radial |
| Imunoeletroforese de Laurell |
| Quimioluminescência |
| Espectroscopia de fluorescência |
| Imunoturbidimetria |
| Imunonefelometria |
| Radioimunoensaio |
| Imunocromatografia |

a. Princípio da eletroforese

O princípio básico da eletroforese proteica baseia-se no movimento de proteínas carregadas num meio líquido, sob a influência de um campo elétrico (Eckersall, 2008).

A eletroforese de zona ou de suporte é a técnica com aplicação clínica de utilização mais comum. Nesta técnica, moléculas carregadas migram como bandas, normalmente sobre um meio de suporte poroso que pode ser: papel de filtro, agarose, acetato de celulose, gel de amido ou poliacrilamida, após a amostra ter sido misturada com uma solução tampão. O que irá dar origem a um eletroferograma, uma exposição das bandas proteicas, distintamente separadas entre si, no material do meio de suporte (Karcher & Landers, 2006).

As proteínas possuem na constituição dos seus aminoácidos diversos grupos amina ($-NH_2$) e carboxilo ($-COOH$) ionizáveis que fazem com que as proteínas se comportam como anfólitos em solução. Anfólitos são moléculas que tanto podem apresentar carga positiva como negativa dependendo do pH da solução onde se encontram. Numa solução com um pH inferior ao seu ponto isoelétrico (pI) apresentam carga positiva (recebem prótons), numa solução com um pH superior ao seu pI apresentam carga negativa (cedem prótons) (Karcher & Landers, 2006). Assim sendo, com pH neutro, as proteínas que possuem uma elevada proporção de aminoácidos ácidos adquirem carga negativa ao ionizarem-se e migram em direção ao ânodo (elétrodo positivo), ao passo que as que possuem uma elevada proporção de aminoácidos básicos adquirem carga positiva e migram em direção ao cátodo (elétrodo negativo). A eletroforese é normalmente realizada a um pH alcalino (8.6) conduzindo a que a maioria das proteínas adquiram carga negativa e que se movam em direção ao ânodo quando uma corrente elétrica é aplicada através da solução (Eckersall, 2008).

A taxa de migração depende de fatores como: a carga elétrica da molécula, dimensão e forma da molécula, força do campo elétrico, propriedades do meio de suporte e temperatura da operação (Karcher & Landers, 2006).

Após concluída a eletroforese, as proteínas são coradas de modo a poderem ser visualizadas. O corante normalmente utilizado é o negro de amido. Uma vez realizada a coloração e a diafanização do meio de suporte, a proporção de proteínas em cada fração pode ser estimada através de densitometria. A maioria dos densitómetros gera uma representação gráfica das leituras de absorvência e calcula a percentagem de proteínas por fração, permitindo assim, quando a concentração de PT é conhecida, determinar o valor absoluto de cada fração proteica (Eckersall, 2008).

a. Eletroforese em acetato de celulose e agarose

Durante várias décadas a eletroforese em acetato de celulose (CAE) foi o método utilizado em laboratórios de diagnóstico, porém a maior facilidade de utilização, reprodutibilidade e disponibilidade comercial de géis de agarose especialmente concebidos para eletroforese proteica, fez com que a eletroforese em gel de agarose (AGE) se tornasse o método mais comum (Archer & Battison, 1997).

As membranas de acetato de celulose são tiras secas, opacas e frágeis obtidas a partir do tratamento da celulose com anidrido acético. Estas membranas necessitam de ser submersas na solução tampão, de forma a suavizá-las, antes de ser realizada a eletroforese e necessitam de ser diafanizadas antes da sua leitura pelo densitómetro.

A agarose é uma fração purificada do agar que é obtida através da sua separação da agarpectina. É utilizada na AGE para separar proteínas séricas, urinárias, do líquido cefalorraquidiano, e ainda para separação de variantes da hemoglobina, isoenzimas, lipoproteínas e outras substâncias. A separação é baseada unicamente na razão massa/carga uma vez que, a dimensão dos poros no gel de agarose permite a passagem de todas as proteínas de forma livre. O gel de agarose apresenta como principais vantagens a sua baixa afinidade para as proteínas e a sua clareza natural após a secagem, o que permite excelentes leituras ao densitómetro. Outra das características do gel de agarose é estar praticamente livre de grupos ionizáveis, o que leva a que apresente pouca endosmose (Karcher & Landers, 2006).

A mobilidade das proteínas, tanto na CAE como na AGE, depende de dois fatores: da carga elétrica que a proteína apresenta ao pH do tampão (normalmente alcalino) e da sua dimensão. Nas condições referidas anteriormente, a albumina apresenta uma carga negativa alta para além de ser relativamente pequena; estes dois fatores conjugados tornam a albumina uma das proteínas com maior mobilidade em direção ao ânodo.

No outro extremo as imunoglobulinas (especialmente as γ -globulinas) apresentam a carga negativa menor, para além de possuírem uma maior dimensão levando a que sejam o grupo de proteínas com menor mobilidade eletroforética.

As α - e β -globulinas possuem uma mobilidade intermédia quando comparadas com a albumina e as γ -globulinas (Eckersall, 2008). A AGE permite subdivisão destes grupos, sendo que as frações α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 e γ_2 das proteínas podem ser observadas, embora tal possa variar entre espécies e amostras (Trumel, Schelcher, Braun & Guelfi, 1996). A CAE normalmente apenas permite identificar as frações α_1 , α_2 , β e γ para além da albumina. Assim sendo a CAE e a AGE, aparte da albumina, apenas permitem separar o soro em diferentes frações sendo cada uma delas composta por diversas proteínas (Eckersall, 2008).

b. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e focalização isoelétrica

O meio de suporte mais utilizado na eletroforese proteica fora dos laboratórios de diagnóstico é o gel de poliacrilamida (Eckersall, 2008). A poliacrilamida é um polímero obtido através do aquecimento da acrilamida com uma variedade de catalisadores (Karcher & Landers, 2006). Durante a polimerização da acrilamida para formar o gel utilizado na PAGE, a proporção de ligações cruzadas entre as cadeias do polímero podem ser controladas. O gel obtido forma uma “peneira molecular” que retarda a migração das proteínas de uma forma mais ou menos acentuada consoante a dimensão das mesmas (Eckersall, 2008). A separação das proteínas na PAGE é, então, efetuada com base na razão massa/carga das proteínas.

As grandes vantagens dos géis de poliacrilamida são a termoestabilidade, a transparência, a durabilidade para além de serem relativamente inertes do ponto de vista químico. Para além disso, não possuem carga o que faz com que não se observe endosmose e possam ser preparadas com poros de diferentes dimensões (Karcher & Landers, 2006).

Uma das variações desta técnica é o dodecilsulfato de sódio (SDS) – PAGE. Nesta técnica, introduzida por Laemmli (1970), as proteínas são pré-tratadas através do seu aquecimento numa solução com um detergente (o SDS) e um agente redutor como o β -mercaptoetanol. Estes têm o efeito de separar as subunidades unidas por ligações dissulfúricas e de cobrir todas as proteínas com carga negativa, de modo a que a separação ocorra com base única e exclusivamente na dimensão das proteínas, uma vez que todas as proteínas irão deslocar-se para o ânodo devido à sua carga negativa (Laemmli, 1970). Com a SDS-PAGE as proteínas deixam de ser agrupadas em regiões de globulinas e passam a agrupar-se num grupo de bandas definidas pela sua massa molecular relativa. Isto vai aumentar a complexidade de interpretação do eletroferograma. Este fator conjugado com os métodos tecnicamente mais exigentes que a SDS-PAGE exige, faz com que esta técnica esteja confinada aos laboratórios de investigação (Eckersall, 2008).

Outra técnica de separação para o fracionamento eletroforético de misturas proteicas, introduzida por Righetti e Drysdale (1971) é a focalização isoelétrica (IEF). Esta técnica, que pode ser realizada em géis de agarose ou poliacrilamida, difere das outras formas de eletroforese por separar as proteínas com base apenas na sua carga elétrica. A presença de reagentes especiais no tampão, denominados anfólitos, cria um gradiente de pH logo que uma voltagem elétrica é criada através do gel. As proteínas irão mover-se devido à sua carga relativa, porém ao atingirem o seu pI no gradiente de pH, interrompem o seu movimento, uma vez que agora têm carga zero. Este método possui uma elevada resolução e permite separar isoformas de proteínas com apenas ligeiras diferenças nas suas cargas, porém devido à sua grande complexidade este método não foi adotado por laboratórios bioquímicos clínicos de diagnóstico para a separação de proteínas séricas (Eckersall, 2008).

1.2.2.2 Proteínas de fase aguda

As proteínas de fase aguda são um conjunto de proteínas presentes no plasma sanguíneo, cuja concentração sofre alterações em animais sujeitos a agressões externas ou internas, como infecção, inflamação, trauma, trauma cirúrgico, crescimento neoplásico, stresse e lesões teciduais em geral.

As APP são componentes do sistema imunitário inato não específico e estão envolvidas no restabelecimento da homeostasia e na limitação do crescimento microbiano, de modo a que o animal possa ter tempo para desenvolver a resposta imunitária adquirida adequada à agressão. De forma a alcançar estes objetivos todas as APP possuem múltiplas funções: modulação do sistema imunitário, transporte de outras proteínas, e proteção dos tecidos contra as lesões causadas pelo processo inflamatório (Cray, Zaias & Altman, 2009a; Murata, Shimada & Yoshioka, 2004; Gruys *et al.*, 2005a).

As APP são sintetizadas primariamente pelos hepatócitos como parte da resposta de fase aguda (Cray *et al.*, 2009a). Porém, atualmente existem evidências crescentes da sua síntese extra-hepática. Nos seres humanos por exemplo, Gahmberg e Andersson (1978) demonstraram que os linfócitos são capazes de produzir α -1-glicoproteína ácida (AGP). Está também descrita a produção de AGP em outros órgãos como são o caso dos rins, intestino, coração e ainda em vários tipos de leucócitos (Fournier, Medjoubi-N & Porquet, 2000). Foi também demonstrado que tecidos como intestino, rim, medula óssea, adipócitos (em casos de hiperglicemia) e glândula mamária (no caso de vacas com mastite) sintetizam proteína amiloide A sérica (SAA) em diferentes espécies animais (Eckersall *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2001). Em aves com artrite crónica está demonstrado que as células sinoviais podem sintetizar SAA (Gruys *et al.*, 2005a; Upragarin, Landman, Gastra & Gruys, 2005a). Foi proposto que a produção de APP a nível local em conjunto com a síntese hepática poderá contribuir para manutenção da homeostasia, através da redução das lesões nos tecidos que estão associadas ao processo inflamatório (Fournier *et al.*, 2000).

Em medicina aviária o estudo das APP tem incidido fundamentalmente nos animais pertencentes à ordem dos galiformes, principalmente as galinhas, que pela sua vertente de produção, têm sido objeto de maior número de publicações (Chamanza, Toussaint, van Veen, Hulskamp-Koch & Fabri, 1999; Xie *et al.*, 2002c). Nestes animais, a principal aplicação da avaliação das APP está relacionada com a monitorização da saúde aviária e a identificação de lesões inacessíveis aquando da inspeção no matadouro. A avaliação das APP pode complementar os achados *post-mortem* na determinação da higidez aviária (Chamanza *et al.*, 1999).

Uma vez que os níveis atingidos pelas APP estão relacionados com a gravidade da doença, estas têm também valor clínico no que concerne ao diagnóstico, prognóstico e monitorização do tratamento (Cray *et al.*, 2009a; Eckersall & Bell, 2010). De acordo com vários autores a avaliação de apenas uma proteína na monitorização dos processos

patológicos não é aconselhável. Atualmente em medicina veterinária são avaliadas um conjunto de proteínas que são designadas por APP index (Gruys *et al.*, 2006; Toussaint, van Ederen & Gruys, 1995).

As APP são agrupadas de acordo com a sua alteração na concentração em positivas, se existe um aumento; e em negativas, se existe uma diminuição na sua concentração (Tabela 3) (Eckersall, 2008). As APP positivas (glicoproteínas na sua grande maioria) são ainda classificadas de acordo com a magnitude do seu aumento durante a resposta de fase aguda, em maiores, moderadas e menores (Céron, Eckersall & Martínez-Subiela, 2005; Eckersall, 2008). As proteínas maiores apresentam concentrações séricas baixas em animais saudáveis, sofrendo aumentos na sua concentração na ordem das 10 a 100 vezes após estimulação, atingindo o pico 24 a 48 horas após a agressão e diminuindo rapidamente posteriormente. As proteínas moderadas estão presentes no sangue de animais saudáveis, sofrendo aumentos na ordem das 5 a 10 vezes após estimulação e atingindo o pico de concentração 2 a 3 dias depois da agressão, ocorrendo de seguida uma diminuição na sua concentração, que acontece de forma mais lenta que a diminuição das proteínas maiores. Finalmente, as proteínas menores apresentam um aumento gradual dos seus níveis atingindo apenas 50 % a 100 % de aumento em relação ao seu nível basal. Esta classificação varia conforme os autores; Eckersall (2008), por exemplo, estipula que os aumentos nas proteínas maiores são na ordem das 100 a 1000 vezes (Cray *et al.*, 2009a; Eckersall, 2008). É ainda importante referir que existem diferenças substanciais entre as espécies no que diz respeito às alterações que ocorrem nas APP durante a resposta de fase aguda. A transferrina por exemplo é uma proteína negativa na grande maioria das espécies ao passo que nas aves constitui uma proteína positiva moderada. Já a proteína C reativa (CRP) que é uma proteína maior no homem, cão e porco, nos ruminantes e nas aves a sua concentração permanece praticamente inalterada perante um processo infeccioso ou inflamatório (Chamanza *et al.*, 1999; Eckersall, 2000).

Tabela 3. Principais proteínas de fase aguda positivas e negativas em aves

| Positivas | Negativas |
|---------------------------------|-----------|
| Proteína amiloide A sérica | Albumina |
| Proteína C reativa | |
| α -1-glicoproteína ácida | |
| Fibrinogénio | |
| Transferrina | |
| Ceruloplasmina | |

1.2.2.2.1 Resposta de fase aguda

A imunidade inata representa o conjunto de mecanismos de defesa antimicrobiana do hospedeiro que são rapidamente ativados após uma agressão ao seu sistema imunológico, e que estão presentes de alguma forma em todos os organismos multicelulares (Suffredini, Fantuzzi, Badolato, Oppenheim & O'Grady, 1999). A imunidade inata é responsável ainda pela iniciação da imunidade adquirida (Cray *et al.*, 2009a). Uma das manifestações da imunidade inata é a resposta de fase aguda (APR) que é uma reação sistêmica proeminente do organismo a distúrbios locais ou sistêmicos à sua homeostasia, causados por infecção, lesão tecidual, trauma, cirurgia, crescimentos neoplásicos ou alterações imunológicas (Gruys *et al.*, 2006). A APR é um processo dinâmico que envolve alterações sistêmicas e metabólicas, e que providencia um mecanismo de defesa precoce não específico contra o insulto antes que a imunidade específica tenha tempo de se desenvolver (Petersen, Nielsen & Heegaard, 2004).

No local da invasão por microrganismos e/ou lesão tecidual são desencadeadas uma série de respostas pelo próprio tecido. São libertadas citocinas pró-inflamatórias e ocorre a ativação tanto do sistema vascular como de diversas células inflamatórias, o que por sua vez irá desencadear uma maior produção de citocinas e de outros mediadores inflamatórios que se difundem para o compartimento extracelular e passam para a circulação sanguínea (Gruys *et al.*, 2005b). As citocinas ativam recetores em diversas células alvo conduzindo a uma reação sistêmica que resulta na ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) e na alteração do padrão de síntese hepática, e ainda em alterações físicas clinicamente caracterizadas por febre, anorexia, balanço nitrogenado negativo e catabolismo das células musculares (Adelman *et al.*, 2010; van Miert, 1995). As principais citocinas envolvidas na APR são a IL-1 β , IL-6 e o interferon gama (IFN- γ) (Leshchinsky & Klasing, 2001; Lynagh & Kaiser, 2000). Estas citocinas aumentam significativamente a sua concentração no decurso da APR, e apresentam uma atividade biológica semelhante às suas homólogas nos mamíferos (Leshchinsky & Klasing, 2003). A IL-1 β , IL-6 e o IFN- γ são responsáveis por alguns dos efeitos sistêmicos que são característicos da APR, para além de serem responsáveis pela ativação dos precursores das células da linha branca, nos tecidos linfoides e pelo crescimento de fibroblastos do tecido inflamatório e de macrófagos (Gruys *et al.*, 2005b; Takahashi, Aoki, Takimoto & Akiba, 2008). A regulação da síntese da IL-1 β , do IFN- γ e da IL-6 está intimamente ligada entre si, uma vez que as duas primeiras induzem a síntese da última e a IL-6 inibe a expressão da IL-1 β (Kaiser & Stäheli, 2008; Tsujinaka *et al.*, 1995). É ainda importante realçar que a expressão do IFN- γ é estimulada pela IL-1 β e por si próprio (Leshchinsky & Klasing, 2003).

Um dos eventos mais importantes que ocorrem durante a APR é a alteração drástica do padrão de síntese proteica do fígado. Esta alteração dá-se poucas horas depois da infecção provocando alterações nas concentrações de várias proteínas plasmáticas, as já referidas

APP. O fígado utiliza os aminoácidos disponibilizados pela degradação proteica que ocorre no músculo esquelético, induzida pela IL-1 β e IL-6, para realizar a síntese das APP, processo este que é induzido pelas citocinas pró-inflamatórias, em particular pela IL-6, e facilitado pelos glucocorticoides (Gruys *et al.*, 2005b; Johnson, 1997). Este processo leva a um aumento expressivo de algumas das APP (as positivas), tornando-as o principal produto de secreção por parte do fígado. Estas têm um papel importante no aumento da imunidade inata, na regulação da atividade das citocinas e na proteção dos tecidos contra alguns dos efeitos nocivos resultantes da resposta inflamatória (Heinrich, Castell & Andus, 1990; Heinrich, Behrmann, Müller-Newen, Schaper & Graeve, 1998; Klasing & Korver, 1997).

A síntese hepática das APP está fortemente ligada à ação de IL-1 β , uma vez que esta citocina é uma das principais responsáveis pelo catabolismo muscular, aumentando assim o fluxo de aminoácidos para o fígado (Gruys *et al.*, 2005b). Outro interveniente neste processo são as células de Kupffer, que após a estimulação pelas citocinas pró-inflamatórias, produzem IL-6 e apresentam-na aos hepatócitos (Knolle *et al.*, 1995).

A IL-6 está também envolvida na ativação dos heterófilos plasmáticos (Kaiser, Rothwell, Goodchild & Bumstead, 2004; Xie, Rath, Huff, Huff, & Balog, 2000) que, por sua vez, induzem a expressão de IL-6 e IL-1 β (Juul-Madsen, Viertlboeck, Smith & Göbel, 2008). Esta citocina assume ainda um papel importante no desenvolvimento da resposta imune adaptativa, ao estimular a diferenciação de linfócitos B e de células T citotóxicas (Kaiser *et al.*, 2000).

A ativação do HAA, outro evento importante na APR, é da responsabilidade da IL-1 β e da IL-6. Estas duas citocinas atuam de forma sinérgica sobre o HHA induzindo a síntese da hormona de libertação da corticotropina (CRH), que origina a síntese da hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que por sua vez estimula as glândulas adrenais conduzindo a um aumento na concentração de glucocorticoides (Klasing & Korver, 1997). Estes produzem vários efeitos na APR: para além da já mencionada ação a nível da síntese hepática das APP, os glucocorticoides inibem a síntese de proteínas do músculo esquelético, que conjugada com a degradação proteica anteriormente referida origina o catabolismo das células musculares observado na APR. Os glucocorticoides têm ainda um papel na inibição da produção de citocinas pelos monócitos e macrófagos, funcionando como um travão da APR, impedindo que esta progrida para níveis patológicos (Adelman *et al.*, 2010; Gruys *et al.*, 2005b).

A regulação negativa da APR hepatocitária é atingida pela rápida remoção das citocinas em circulação (Heinrich *et al.*, 1998), pela produção de IL-10 pelas células de Kupffer que vai suprimir a produção local de IL-6 (Knolle *et al.*, 1995), pela supressão genética e pela própria IL-6, uma vez que esta inibe a produção mononuclear fagocitária da IL-1 β , interrompendo assim a cascata de reação (Heinrich *et al.*, 1990; Heinrich *et al.*, 1998). Outra citocina com uma função imunomoduladora importante é o fator de transformação do

crescimento beta 2 (TFG- β 2). Esta citocina regula a resposta inflamatória através do efeito supressivo que têm sobre os linfócitos, monócitos e macrófagos (Leshchinsky & Klasing, 2003; Sijben *et al.*, 2001).

A anorexia, outra das alterações sistêmicas observadas na APR, resulta da ação da IL-6 e em particular da IL-1 β . Estas duas citocinas têm efeitos profundos a nível comportamental, neuroendócrino e metabólico (Johnson, Curtis, Dantzer & Kelley, 1993; Johnson, 1997).

No mecanismo da febre também estão envolvidas as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 β . A IL-6 ativa a síntese de prostaglandinas ao passo que a IL-1 β também atua como um agente pirogênico ao elevar a taxa metabólica basal (Klasing & Korver, 1997; Leshchinsky & Klasing, 2001). A febre é considerada uma resposta benéfica uma vez que aumenta a atividade das células do sistema imunitário e a síntese de proteínas de choque térmico (Leshchinsky & Klasing, 2001).

É ainda importante realçar o papel da MGF nas aves. Esta citocina pertencente ao grupo de fatores de estimulação de colónias, estando intimamente relacionada do ponto de vista estrutural com a IL-6 e com o fator de estimulação de colónias de granulócitos dos mamíferos, no entanto, sempre se pensou que se tratava de uma molécula distinta específica das aves (Kaiser & Stäheli, 2008). Contudo, estudos recentes levantaram a hipótese da MGF ser na realidade o fator de estimulação de colónias de granulócitos (Santos, Yasuike, Hirono & Aoki, 2006). A MGF atua como a IL-6 na indução da APR e apresenta ainda atividades relacionadas com fator de estimulação de colónias de macrófagos e o fator de estimulação de colónias de granulócitos-macrófagos (Leshchinsky & Klasing, 2003).

Durante a APR ocorre ainda a ativação do sistema complemento e do sistema de coagulação sanguínea, e a diminuição dos níveis séricos de cálcio, zinco, ferro, vitamina A e α -tocoferol (Céron *et al.*, 2005; Gruys *et al.*, 2006).

Pensa-se que a APR, através das alterações que provoca na composição do plasma sanguíneo, seja benéfica para o organismo ao prevenir o crescimento microbiano e restabelecendo a homeostasia. Algumas APP opsonizam os microrganismos e ativam o complemento enquanto outras recolhem os remanescentes celulares e radicais livres, ou neutralizam as enzimas proteolíticas (Gruys *et al.*, 2005b).

Na figura 3 encontra-se representada de forma esquemática a resposta de fase aguda.

Estímulo
(Infecção, lesão tecidular, trauma, cirurgia, crescimento neoplásico, alterações imunológicas)

Fibroblastos
Células endoteliais

Macrófagos

IL-1 β
IL-6

MGF

Atração e ativação dos heterófilos

Fígado

APP

Leucocitose
Ativação do complemento
Inibição das peptidases
Coagulação
Opsonização

HHA

Glucocorticoides

TGF- β 2
IL-10

Estimulação
Inibição
Síntese

A CRP tem um papel relevante na proteção contra processos infecciosos, eliminação de tecidos alterados, prevenção de reações autoimunes e regulação da resposta inflamatória. Estas funções estão relacionadas com a sua estrutura pentamérica cíclica que lhe confere a capacidade de se ligar a diversas bactérias patogénicas ou antigénios intracelulares de células danificadas, reconhecendo moléculas estranhas ao organismo bem como moléculas próprias que sofreram algum tipo de alteração (Mold, Rodriguez, Rodic-Polic & Du Clos, 2002). Tem ainda a capacidade de ativar o sistema complemento pela via clássica conduzindo à opsonização do patógeno, de interagir com recetores específicos em células

fagocíticas mediando a fagocitose, de induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias e ainda, de se ligar a receptores de imunoglobulinas, ligando assim a imunidade inata não específica à imunidade adaptativa específica (Du Clos & Mold, 2001; Murata *et al.*, 2004).

Existe uma variação interespecífica considerável no que diz respeito à fisiopatologia da CRP. Em algumas espécies como os cães e os suínos, a CRP é uma proteína maior e a sua concentração sérica pode aumentar rapidamente, passando de concentrações inferiores a 0,5 mg/dL para concentrações superiores a 10 mg/dL. Já em espécies como bovinos, felinos e aves, esta proteína está presente no soro sofrendo apenas aumentos ligeiros no decorrer da doença (Cray *et al.*, 2009a; Eckersall, 2008).

Como já foi referido a CRP não é uma proteína maior nas aves, no entanto, estudos realizados reportaram aumentos significativos dos seus níveis em galinhas com infeções naturais por protozoários, como a *Eimeria* spp. e *Histomonas* (Juul-Madsen *et al.*, 2008). Foram ainda descritas influências ambientais e nutricionais nos níveis desta proteína, ocorrendo elevações nos seus níveis em animais em stresse térmico e reduções em animais cuja alimentação regular foi suplementada com probióticos baseados em *Lactobacillus* e mananoligossacarídeos, redução que pode ser atribuída à supressão de citocinas pró-inflamatórias (Sohail *et al.*, 2010).

1.2.2.2.3 Haptoglobina

A haptoglobina (Hp) é uma glicoproteína, pertencente ao grupo das α_2 -globulinas com um peso molecular de 125 kDa aproximadamente (Petersen *et al.*, 2004).

A Hp é uma das proteínas hepáticas mais abundantes nos fluídos corporais (Martin, Alam, Imboma & Liebl, 2010). A sua função principal está relacionada com a sua capacidade de se ligar a resíduos livres de hemoglobina (Hb), formando complexos estáveis com esta, no sangue (Petersen *et al.*, 2004). A afinidade da Hp para a Hb é uma das mais elevadas entre as proteínas de transporte. A remoção da Hb livre da circulação previne lesões oxidativas nos tecidos causadas pela própria Hb (Eckersall, 2008; Yang *et al.*, 2002). A formação do complexo Hp-Hb conduz igualmente a uma diminuição dos grupos heme livres, e por consequência, do ferro disponível, o que tem um efeito bacteriostático uma vez que o ferro é necessário para o crescimento bacteriano (Berzins, Gilchrist, Matson & Burness, 2010; Petersen *et al.*, 2004). Este complexo é reconhecido pelo CD163, um recetor específico existente na superfície dos macrófagos, e eliminado pelos fagócitos. Existe uma grande variedade de efeitos imunomoduladores que podem ser atribuídos a Hp, sendo que esta imunomodulação é mediada parcialmente através da ligação da Hp aos receptores CD11/CD18 das células efectoras. Esta proteína tem um efeito inibitório na quimiotaxia dos granulócitos, fagocitose e atividade bactericida. A Hp pode ainda inibir a proliferação dos mastócitos, prevenir a maturação espontânea das células epidérmicas de Langerhans ou suprimir a proliferação das células T (Murata *et al.*, 2004). Pensa-se que os complexos Hp-

Hb são conduzidos pelo sistema reticuloendotelial para o fígado, sendo então metabolizados pelas células de Kupffer (Petersen *et al.*, 2004).

O perfil de fase aguda da Hp difere entre as espécies. Nos ruminantes, é uma proteína maior cujos níveis normais em circulação encontram-se abaixo dos 2 mg/dL, podendo alterar a sua concentração para valores na ordem dos 0,2 g/dL poucos dias após uma infecção. Nos cães, felinos, equinos e suínos é uma proteína moderada cuja concentração normal está na gama dos 0,1 g/dL até 0,2 g/dL, ao passo que em doenças infecciosas ou inflamatórias pode elevar-se até 0,5 g/dL ou mais (Eckersall, 2008).

A Hp nas aves não tem sido objeto de uma investigação aprofundada, existindo pouca informação no que concerne às suas alterações no curso de um processo infeccioso e/ou inflamatório. Aumentos significativos dos níveis de Hp, em comparação com animais controlo, foram encontrados em galinhas infetadas com o vírus da bronquite infecciosa (Nazifi, Tabande, Hosseini, Ansari-Lari & Safari, 2009a). Em maçaricos-de-papo-vermelho (*Calidris canutus islandica*), foram observados aumentos da concentração de Hp para quase o dobro em animais estimulados com um lipopolissacárido (LPS) (Buehler *et al.*, 2009). No entanto, num estudo realizado em galinhas infetadas com o vírus da doença de Gumboro e aves controlo, não foram encontradas diferenças significativas na concentração de Hp entre animais infetados e saudáveis (Nazifi, Dadras, Hoseini, Ansari-Lari & Masoudian, 2009b).

1.2.2.2.4 Proteína amiloide A sérica

A SAA é uma apolipoproteína de fase aguda, com um peso molecular de cerca de 14 kDa, que se encontra associada a lipoproteínas de alta densidade, formando complexos com cerca de 180 kDa de peso molecular, no soro (Jensen & Whitehead, 1998; Upragarin, Van Asten, Tooten, Landman & Gruys, 2005b).

A SAA é uma APP multifuncional desempenhando um papel importante na APR. Esta proteína, ao ligar-se às lipoproteínas de alta densidade, permite que estas promovam o efluxo de colesterol a partir dos monócitos (macrófagos), facilitando assim a absorção e remoção do colesterol nos locais de inflamação. As lipoproteínas de alta densidade circulantes são transportadas até ao fígado, onde o colesterol é absorvido pelos hepatócitos. É possível então afirmar, que a SAA medeia o transporte reverso de colesterol do tecido para os hepatócitos, de modo a otimizar a eliminação do colesterol de células moribundas nos locais de inflamação (Jensen & Whitehead, 1998). Estão ainda descritos efeitos inibitórios por parte da SAA em diversos aspetos da resposta imune, incluindo febre, produção da prostaglandina E₂, agregação plaquetária, produção de anticorpos, proliferação de linfócitos e células endoteliais. A SAA inibe ainda a adesão dos linfócitos T às proteínas da matriz extracelular (Jensen & Whitehead, 1998; Murata *et al.*, 2004). Esta proteína, quando na forma livre, está envolvida no recrutamento quimiotático de células inflamatórias para o local de infeção. Desempenha também um papel importante na destoxificação de

endotoxinas (Murata *et al.*, 2004). Está também descrita uma ação antibacteriana direta por parte da SAA, onde esta se liga a bactérias Gram negativas, conduzindo à opsonização da bactéria alvo (Hari-Dass, Shah, Meyer & Raynes, 2005).

No que diz respeito à fisiopatologia, existem diferenças entre as diferentes espécies. Nos bovinos, suínos, equinos, cães e gatos a SAA é uma proteína maior (Eckersall, 2008; Kovács *et al.*, 2007). Nas aves não existe um consenso na classificação desta proteína, existindo alguns autores que a classificam como uma proteína moderada nas galinhas (Chamanza *et al.*, 1999; Cray *et al.*, 2009a) ao passo que outros consideram-na uma proteína maior nas galinhas e nos gansos (Juul-Madsen *et al.*, 2008; Kovács, *et al.*, 2007).

Em aves estão descritos aumentos de 10 a 100 vezes na concentração de SAA, após estimulação com *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus* (Chamanza *et al.*, 1999; Juul-Madsen *et al.*, 2008). Estas alterações são rápidas, observando-se uma diminuição da concentração de SAA quando a infeção se torna crónica. A avaliação da concentração da SAA pode, então, ser uma ferramenta viável para a deteção de lesões inflamatórias que podem passar despercebidas à inspeção. Este facto assume especial importância em animais de produção como é o caso das galinhas (Chamanza *et al.*, 1999). A determinação da SAA é ainda importante na prevenção de casos de amiloidose reativa. Esta doença é caracterizada pela deposição de fibrilas extracelulares insolúveis (compostas principalmente por proteína amiloide A, cujo precursor é a SAA) primariamente no fígado e posteriormente noutros órgãos como é o caso do baço, ou ainda nas articulações provocando artropatia amiloidótica (Guo *et al.*, 1996; Kovács *et al.*, 2007; Upragarin *et al.*, 2005b). Esta doença resulta de níveis elevados de SAA, normalmente associados a processos inflamatórios crónicos (Kovács *et al.*, 2007).

1.2.2.2.5 α -1-glicoproteína ácida

A AGP é uma glicoproteína com cerca de 30 kDa de peso molecular, da qual aproximadamente 25 % correspondem a carboidratos ligados de forma covalente (Zsila, Matsunaga, Bikádi & Haginaka, 2006).

Ainda que tenha sido objeto de vários estudos, a função concreta da AGP permanece pouco clara. Contudo, numerosas atividades com significado fisiológico foram descritas. Assim sendo, a nível local a AGP pode contribuir para a manutenção da homeostasia através da redução das lesões tecidulares que ocorrem nos tipos celulares extra-hepáticos, em particular nas células endoteliais e epiteliais. A nível sistémico, a AGP tem duas funções fisiológicas principais: imunomodulação e ligação a compostos farmacológicos (Fournier *et al.*, 2000). Tal como a albumina, a principal proteína de ligação a fármacos, a AGP liga-se e transporta vários metabolitos, quer de origem endógena como de origem exógena, nomeadamente a heparina, a histamina, a serotonina, os esteroides e as catecolaminas (Fournier *et al.*, 2000; Israili & Dayton, 2001). Esta capacidade de se ligar aos compostos

farmacológicos pode ter repercussões a nível da terapêutica, uma vez que a ligação da AGP aos fármacos pode diminuir a concentração destes na sua forma livre, que é a fração metabolicamente ativa, afetando assim a sua farmacocinética (Ikenoue, Saitsu, Shimoda & Kokue, 2000). A capacidade de se unir a ligandos de baixo peso molecular permite ainda a esta proteína ter um papel protetor, uma vez que esta liga-se a lectinas tóxicas e a endotoxinas. Como referido anteriormente AGP tem um papel imunomodulador, atua como um agente anti-inflamatório inibindo a fagocitose, a agregação plaquetária e aumentando a secreção do antagonista do recetor da IL-1 pelos macrófagos, podendo ainda desempenhar um papel na maturação dos linfócitos B e T (Fournier *et al.*, 2000; Israili & Dayton, 2001). A AGP pode ainda aumentar a eliminação de LPS, ao ligar-se diretamente a estes, neutralizando a sua toxicidade. Esta proteína inibe ainda a proliferação linfocitária induzida por mitogénios e a atividade das células “natural killer” (Murata *et al.*, 2004). Finalmente, a AGP possui a capacidade de inibir a aderência do *Mycoplasma pneumoniae* aos macrófagos alveolares e de inibir algumas estirpes do vírus influenza (Israili & Dayton, 2001).

Na maioria das espécies, a AGP é uma proteína moderada, aumenta mais lentamente que as proteínas maiores, porém, permanece elevada durante um período de tempo maior (Eckersall, 2008).

Nas aves a AGP é uma proteína maior, podendo aumentar a sua concentração cerca de 10 a 100 vezes após um estímulo (Juul-Madsen *et al.*, 2008). Concentrações elevadas de AGP foram descritas em galinhas infetadas com o vírus da laringotraqueíte infecciosa e com o vírus da bronquite infecciosa, provocando este último aumentos nos níveis de AGP mais significativos que o primeiro (Nakamura, Imai & Tanimura, 1996). Foram também descritos aumentos desta proteína em infeções por patógenos bacterianos, nomeadamente em galinhas injetadas com o LPS da *Escherichia coli* e galinhas infetadas com *Salmonella enteritidis* (Nakamura *et al.*, 1998; Takahashi, Miyake, Ohta, Akiba & Tamura, 1998; Takahashi, Ohta & Akiba, 1997). A AGP é vista como um parâmetro sérico promissor na deteção de problemas infecciosos nas galinhas, especialmente quando a gravidade da infeção é exacerbada pelo stresse (Holt & Gast, 2002).

1.2.2.2.6 Transferrina-Ovotransferrina

Foi demonstrado que a transferrina (Tf) sérica secretada pelos hepatócitos, e a ovotransferrina (ovo-Tf) secretada no oviduto são a mesma proteína, diferindo apenas na extensão da glicosilação e na composição dos seus carboidratos (Xie *et al.*, 2002c; Xie, Huff, Huff, Balog & Rath, 2002b). São glicoproteínas com um pl de cerca de 6.5 e um peso molecular de cerca de 65 kDa (Crouguennec, Nau, Pezennec, Piot & Brulé, 2001).

A principal função fisiológica da Tf, como outros membros da família das transferrinas, é a ligação e transporte de ferro para as células, sendo que as suas atividades bacteriostáticas

e bactericidas estão provavelmente relacionadas com a sua habilidade de sequestrar este metal, que é um elemento essencial para o crescimento bacteriano, contribuindo assim para a imunidade inata (Xie *et al.*, 2002c). A Tf tem ainda efeitos diretos sobre as bactérias, devido à ação de um péptido (OTAP-92) semelhante a uma defensina, que é originado por clivagem proteolítica, e que possui a capacidade de provocar lesões na membrana das bactérias (Ibrahim, Sugimoto & Aoki, 2000). Estão ainda descritos efeitos imunomoduladores por parte da Tf. Esta proteína possui a capacidade de estimular os macrófagos a produzir IL-6, óxido nítrico, e metaloproteinases de matriz (MMP). As MMP são um grupo de proteinases dependentes do zinco, que provocam a clivagem de proteínas da matriz extracelular como o colagénio e proteoglicanos, de modo a facilitar a remodelação tecidual e a angiogénese. As MMP originam ainda a libertação de fatores de crescimento e citocinas ligadas à matriz extracelular que desempenham um papel crítico na reparação dos tecidos. A Tf possui ainda a capacidade de induzir a síntese de IL-6 e MMP pelos heterófilos, bem como de estimular a desgranulação dos últimos (Xie *et al.*, 2002b). Finalmente, alguns autores demonstraram o aumento da síntese da Tf nos fibroblastos e condrócitos em resposta à inflamação e infeção, e ainda a sua capacidade em promover a migração e invasão da membrana basal por células endoteliais (Carlevaro *et al.*, 1997).

Ao contrário dos mamíferos, onde estão descritas diminuições da concentração da Tf em bovinos com infeções agudas, ou em suínos com infeções agudas causadas por salmonelose (Murata *et al.*, 2004), nas aves a Tf é uma proteína moderada positiva aumentando cerca de 10 a 100 vezes após um estímulo inflamatório. Tratamentos com terebintina, LPS ou infeções por retrovírus estiveram na origem de aumentos dos níveis de Tf ao fim de 1 a 3 dias após a estimulação (Juul-Madsen *et al.*, 2008). Concentrações séricas elevadas de IL-6 e um número elevado de heterófilos precedem o aumento da Tf (Xie *et al.*, 2002c), que atinge o pico da concentração após 3 dias, permanecendo elevada até aos 5 dias e retornando à concentração basal após 10 dias (Juul-Madsen *et al.*, 2008). Foram ainda relatados aumentos na Tf após a indução experimental de inflamação (Tohjo *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2002c), e em infeções causadas por *Escherichia coli*, poxvírus aviário, doença de Gumboro, vírus da bronquite e laringotraqueíte infecciosa e reovírus (Xie *et al.*, 2002a). Estão também descritos aumentos da Tf em galinhas durante o período de postura, ou antes deste (a ovo-Tf é sintetizada sobre o controlo do estrogénio), bem como valores mais elevados destas proteínas em animais jovens. O mesmo estudo não encontrou diferenças significativas na concentração de Tf em galinhas com lesões moderadas, severas e crónicas causadas por *S. aureus* (Chamanza *et al.*, 1999).

1.2.2.2.7 Ceruloplasmina

A ceruloplasmina (Cr) é uma ferroxidase que contém cerca de 95 % do cobre sérico, e que oxida o ferro tóxico para a sua forma férrica não tóxica (Murata *et al.*, 2004; Nazifi *et al.*, 2009b). Protege os tecidos de lesões mediadas por radicais livre do ferro, e de metabolitos tóxicos do oxigénio libertados pelas células fagocíticas durante estados inflamatórios, estando ainda envolvida em diversas atividades antioxidantes e citoprotetoras. A Cr pode funcionar como um agente anti-inflamatório, ao atuar como um coletor extracelular do peróxido. Esta proteína está ainda envolvida no transporte de cobre (Céron & Martínez-Subiela 2004; Murata *et al.*, 2004).

Nas galinhas a Cr é uma APP moderada aumentando 10 a 100 vezes após estimulação. Injeções com a endotoxina da *E. coli* conduziram ao aumento imediato em 50 % da concentração plasmática da Cr, e níveis superiores foram descritos após a infeção com *Eimeria tenella* (Juul-Madsen *et al.*, 2008).

1.2.2.2.8 Hemopexina

A hemopexina (Hx) é uma glicoproteína sérica produzida pelo fígado como parte da APR. A principal função desta proteína é ligar-se e transportar para o fígado os grupos heme livres. No fígado estes são internalizados e degradados, sendo o ferro retido para ser reutilizado na síntese de proteínas que contêm este metal, prevenindo-se assim a perda por excreção urinária do ferro que se encontra ligado aos grupos heme (Grieninger *et al.*, 1986; Stred, Cote, Weinstock & Messina, 2003). Como referido anteriormente, diversas bactérias necessitam do ferro para o seu desenvolvimento, porém este metal na forma heme/Hx não pode ser utilizado pela maioria das bactérias. Sendo assim, ao ligar-se e ao transportar os grupos heme libertados pelos eritrócitos lisados, a Hx impede utilização destes últimos pelos microrganismos, inibindo assim o seu crescimento. Desta forma, a Hx desempenha um papel importante no controlo ou prevenção das infeções bacterianas. Quando os grupos heme, livres ou ligados a proteínas, interagem com o oxigénio, podem catalisar a formação de radicais de oxigénio que podem danificar os lípidos e as proteínas. A Hx ao ligar-se aos grupos heme impede a formação destes radicais, prevenindo assim lesões oxidativas (Stred *et al.*, 2003).

Em relação à fisiopatologia da Hx, verificou-se que galinhas tratadas com um LPS de *E. coli* sofreram um aumento na concentração desta proteína, com o início do mesmo a ocorrer entre as 6 e as 12 horas, atingindo o pico dentro das primeiras 24 horas e retornando ao nível basal aos 14 dias (Adler, Peng, Peng & Klasing, 2001). Noutro estudo realizado com injeções de terebintina em galinhas, verificou-se um aumento da Hx que atingiu a concentração máxima às 12 horas (Grieninger *et al.*, 1986). Noutro estudo ainda, também realizado com um LPS de *E. coli*, verificou-se um aumento de 2,6 vezes na concentração de Hx (Barnes, Song, Klasing & Bottje, 2002).

1.2.2.2.9 Inibidores de peptidases

α 1-antitripsina e a α 1-antiquimiotripsina são as APP com maior capacidade de inibição das proteases que são libertadas durante a APR. Durante eventos inflamatórios são sintetizadas principalmente no fígado, com o objetivo de remover as proteases que são libertadas durante a lesão. A α -1-antitripsina possui a capacidade de inibir a atividade das células “natural killer” (Murata *et al.*, 2004). A α 2-macroglobulina, também conhecida como ovomacroglobulina, nas aves é sintetizada no oviduto e é encontrada no albúmen, não sendo encontrada noutros tecidos nem no soro (Lim *et al.*, 2011).

1.2.2.2.10 Lectina de ligação à manose

A lectina de ligação à manose (MBL) é uma proteína pertencente à família das colectinas (Nielsen, Jensenius, Jørgensen & Laursen, 1999). A MBL aviária é um oligómero de subunidades, cada uma composta por três cadeias polipeptídicas de cerca de 30 a 40 kDa de peso molecular, unidas numa hélice tripla com três domínios globulares de reconhecimento de carboidratos (Laursen & Nielsen, 2000).

A MBL é produzida única e exclusivamente no fígado (Nielsen *et al.*, 1999), sendo que medições dos níveis e da distribuição da MBL em diferentes tecidos durante a embriogénese, início da vida e vida adulta, mostraram que a MBL sérica aumenta desde os 11 dias até 1 ano de idade, embora os níveis variem com o tipo de ave (Laursen *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1998).

A função biológica da MBL permanece especulativa, porém interações com uma grande variedade de microrganismos foram demonstradas, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus. Após a ligação com os carboidratos, a MBL é capaz de ativar o complemento através das serinas proteases que lhe estão associadas, conduzindo à clivagem das componentes C4 e C2 do complemento e assim dando origem à C3-convertase. A ação desta convertase conduz à opsonização e lise dos microrganismos (Nielsen *et al.*, 1999).

A MBL das aves, como a dos mamíferos, é uma APP menor aumentando apenas 1.2 a 2 vezes no soro após infeção (Juul-Madsen *et al.*, 2003). Num estudo realizado em galinhas infetadas experimentalmente com o vírus da bronquite infecciosa e com o vírus da laringotraqueíte infecciosa foram descritos aumentos de cerca de 2 vezes na concentração sérica da MBL, com a concentração a atingir o pico 3 a 7 dias depois da infeção nos animais infetados com o vírus da bronquite infecciosa e aos 3 a 5 dias, dependendo da estirpe utilizada, nos animais infetados com o vírus da laringotraqueíte infecciosa. Os níveis de MBL regressaram à normalidade cerca de 6 a 10 dias após a infeção (Nielsen *et al.*, 1999). A ativação do complemento está diretamente associada com a concentração da MBL no soro, suportando a hipótese que o nível sérico de MBL afeta o grau de neutralização dos vírus antes que a resposta imune adaptativa assumo o controlo. A MBL pode influenciar o nível de

resposta mediada por anticorpos específicos ou dirigir a resposta imune para uma resposta mais celular (Juul-Madsen *et al.*, 2003).

1.2.2.3 Proteínas de transporte

As principais proteínas de transporte são a albumina, a transtirretina, as lipoproteínas e a transcortina, para além das já descritas α -1-glicoproteína ácida, hemopexina, haptoglobina, transferrina e ceruloplasmina (Watterson, 2009).

1.2.2.3.1 Albumina

A albumina representa 40 % a 50 % das PT plasmáticas em aves (Campbell, 2006) e possui um peso molecular de cerca de 49 kDa (Xie *et al.*, 2002c).

Após eletroforese proteica, a albumina aparece como a banda mais proeminente e, na maioria das espécies, como a proteína com maior mobilidade em direção ao ânodo de entre todas as proteínas plasmáticas, devido à elevada proporção de aminoácidos ácidos e pequeno tamanho relativo desta proteína. Existe ainda uma variação na mobilidade da albumina entre espécies após eletroforese em agarose, que está relacionada com a proporção de aminoácidos básicos e ácidos da espécie. Espécies com maior percentagem em aminoácidos ácidos apresentam uma maior mobilidade (Eckersall, 2008).

A albumina é sintetizada em polissomas ligados ao retículo endoplasmático rugoso dos hepatócitos, sendo que a albumina não é armazenada a nível hepático não existindo, por isso, uma reserva desta para ser libertada em caso de necessidade. Este facto é contornado pela capacidade dos hepatócitos aumentarem a síntese da albumina em 200 % a 300 % em casos de necessidade. Alterações na taxa de síntese da albumina são controladas primariamente por alterações na pressão osmótica coloidal, e pela osmolaridade do espaço extravascular hepático. A síntese da albumina pode ainda ser influenciada por alterações hormonais, como por exemplo concentrações aumentadas de insulina, tiroxina e cortisol (Evans, 2001).

Apenas cerca de 30 % a 40 % da albumina encontra-se no sangue, a restante está no espaço intersticial. Uma vez secretada para a circulação, a albumina é modificada de forma irreversível e, não enzimática, pela glicação dos resíduos de lisina, o que faz com que cerca de 6 % a 10 % da albumina seja na realidade glicalbumina, devido à conjugação desta com glucose ou galactose (Nakajou, Watanabe, Kragh-Hansen, Maruyama & Otagiri, 2003).

O catabolismo da albumina ocorre em vários tecidos, onde entra nas células por pinocitose, a um ritmo que está relacionado com a concentração do péptido atrial natriurético, sendo então degradado pela ação de proteases (Evans, 2001). Tecido muscular, fígado e rins são os principais contribuidores para o catabolismo da albumina com cerca de 40 % a 60 % da albumina total a ser clivada nestes tecidos (Prinsen & de Sain-van der Velden, 2004).

Uma das funções mais importantes desempenhadas pela albumina é a manutenção da pressão osmótica coloidal e do volume sanguíneo. Esta importante função está desproporcionada relativamente à concentração plasmática desta proteína, uma vez que a albumina representa apenas cerca de 50 % das PT e é responsável por 80 % da pressão osmótica coloidal. Este facto está relacionado com o menor peso molecular da albumina (49 kDa) em comparação com o valor médio dos pesos moleculares das globulinas (170 kDa) e, com o contributo da albumina para o efeito de Donnan devido ao seu baixo *pI* e à sua elevada carga negativa (Prinsen & de Sain-van der Velden, 2004).

Outra importante função da albumina é como proteína de transporte. Existe um grande número de metabolitos que circula no sangue ligado a esta proteína. A ligação à albumina auxilia o transporte de substâncias que são moderadamente solúveis em meios aquosos, e previne a perda de importantes pequenas moléculas através de eliminação renal. A albumina possui a capacidade de se ligar e transportar grandes aniões orgânicos incluindo: a bilirrubina, ácidos gordos de cadeia longa, colesterol, cálcio e magnésio. Está também descrita a capacidade da albumina se ligar ao óxido nítrico, a iões metálicos e hormonas tiróideas. A albumina e Hx com a Hp estão associadas ao transporte da Hb e grupos heme (Evans, 2001; Watterson, 2009). Tal como os metabolitos, uma grande variedade de compostos farmacológicos ligam-se à albumina, tendo sido identificados quatro locais de ligação na molécula. Fármacos como fenitoína, digoxina, anti-inflamatórios não esteróides, midazolam, tiopental e antibióticos interagem com a albumina através destes locais de ligação (Evans, 2001).

A albumina tem ainda um papel importante como agente antioxidante. Esta propriedade está relacionada com o número ímpar de resíduos de cisteína (35), que vai dar origem a que um resíduo de cisteína permaneça livre após a formação das ligações dissulfureto estabilizadoras. Este resíduo livre é um ávido coletor de oxigénio reativo e de radicais de peroxinitrito, o que torna a albumina um dos principais antioxidantes em circulação (Anraku, Yamasaki, Maruyama, Kragh-Hansen & Otagiri, 2001).

A albumina é uma APP negativa, ocorrendo uma diminuição gradual da sua concentração durante doenças infecciosas e inflamatórias (Gruys *et al.*, 2005b). É ainda a principal fonte de aminoácidos utilizada pelo organismo em situações de emergência, nomeadamente em situações de desnutrição (Roman, Bomsel-Demontoy, Levrier, Chaste-Duvernoy & Saint Jalme, 2009a).

1.2.2.3.2 Transtirretina

A transtirretina (TTR) é a fração plasmática das aves que mais rapidamente migra durante a eletroforese. Esta proteína migra em direção ao ânodo relativamente à albumina em aves, primatas e cavalos, embora não seja visualizada nestes últimos, e apresenta uma maior mobilidade eletroforética que a albumina, resultando daí a sua anterior designação de pré-

albumina (Lumeij, 2008). No entanto, a concentração da TTR sofre uma grande variação dentro das espécies aviárias, podendo representar desde 75 % da concentração da albumina total (TTR + albumina) em caturras (*Nymphicus hollandicus*) e periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*) até 10 % da albumina total em outras espécies, ou estar mesmo completamente ausente (Cray & Tatum, 1998).

A forma funcional da TTR nas galinhas é um tetrâmero de 55 kDa composto por cinco subunidades idênticas (Power *et al.*, 2000; Sunde *et al.*, 1996). As subunidades formam um canal cilíndrico central e estreito, com dois potenciais locais de ligação estruturalmente idênticos para as hormonas tiróideas (Chang, Munro, Richardson & Schreiber, 1999).

A síntese da TTR está restrita ao fígado e ao plexo coroide. A TTR sintetizada pelo fígado é secretada para o sangue, ao passo que a que tem origem no epitélio do plexo coroide é secretada para o líquido cefalorraquidiano, transportando hormonas tiróideas essenciais para o cérebro (Power *et al.*, 2000).

A TTR é a principal proteína de ligação às hormonas tiróideas: triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), sendo responsável pelo seu transporte. Esta proteína pode ser encontrada no plasma sanguíneo, líquido intersticial e líquido cefalorraquidiano. A presença da TTR neste último assume grande importância, uma vez que a barreira hematoencefálica limita a passagem de outras proteínas transportadoras de hormonas tiróideas como é o caso da albumina, tornando assim a TTR sintetizada pelo plexo coroide a principal proteína de ligação à T4 no espaço extracelular do cérebro das aves. A TTR das aves, em comparação com a dos humanos, liga-se com maior afinidade à T3 e com menor afinidade à T4, facto que pode estar relacionado com diferenças, a nível da região N-terminal, entre as proteínas das duas espécies (Chang *et al.*, 1999). A TTR possui ainda a capacidade de se ligar à proteína de ligação ao retinol (RBP). A RBP é o transportador específico da forma alcoólica da vitamina A, formando no plasma um complexo macromolecular com a TTR, o que previne a filtração glomerular da RBP a nível renal. A presença do retinol ligado à RBP é essencial para a formação de complexo estável com a TTR (Power *et al.*, 2000; Zanotti *et al.*, 2001).

Estão descritas concentrações sazonais elevadas de TTR plasmática (15 até 20 mg/dL de Maio até Julho e 8 até 10 mg/dL de Setembro até Janeiro) em cegonhas durante a época de mudança da plumagem (Lumeij, 2008).

O comportamento da TTR durante a APR nas aves não é conhecido, contudo estudos realizados em suínos e ratos demonstraram que esta proteína é uma APP negativa nestas espécies (Eckersall, 2008).

1.2.2.4 Proteínas de coagulação

1.2.2.4.1 Fibrinogénio

O Fb é uma glicoproteína de grandes dimensões, com um peso molecular de cerca de 340 kDa, que ocupa cerca de 5 % do plasma total e migra com mobilidade β . Como já foi referido anteriormente, está ausente nas amostras de soro (Cardinali *et al.*, 2010; Doolittle, Spraggon & Everse, 1998).

O Fb tem um papel fundamental na coagulação. Está envolvido na homeostase ao fornecer um substrato para a formação de fibrina e ainda na reparação dos tecidos, ao fornecer uma matriz para a migração das células relacionadas com a inflamação. O Fb tem especial afinidade para as integrinas CD11/CD18 existentes na superfície dos fagócitos migratórios, desencadeando uma cascata de sinais intracelulares que conduzem ao aumento da desgranulação, fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpos e ao atraso da apoptose (Murata *et al.*, 2004).

Embora não ocorram aumentos muito significativos, em comparação com outras proteínas como a SAA ou a AGP, durante o curso da APR, em termos de massa proteica o Fb representa a maior proporção de proteínas plasmáticas sintetizadas durante a APR (Eckersall, 2008).

Em aves foi descrito o aumento do Fb em cerca de 3 a 4 vezes, com o pico aos 3 dias, após a administração de terebintina, regressando aos níveis basais após 7 dias (Juul-Madsen *et al.*, 2008). Springer, Luskus e Pourciau (1977) relataram ainda aumentos na concentração do Fb em infeções combinadas de *E. coli* e *Mycoplasma synoviae* com o vírus da bronquite infecciosa. Pelo contrário, Witlock (1978) não detetou aumentos expressivos desta proteína em casos de galinhas infetadas por *Eimeria tenella*, aflatoxicose ou a combinação das duas, e Galindo-Muniz, Calderon, Charles, Tellez e Fortoul (2001) verificaram não existirem alterações significativas na concentração do Fb em aves infetadas experimentalmente com a doença de Newcastle. Nazifi *et al.*, (2009b) não encontraram igualmente alterações significativas na concentração desta proteína em galinhas infetadas com a doença de Gumboro.

Existem ainda autores que consideram o Fb a APP com maior importância clínica dentro daquelas que migram, durante a eletroforese, no grupo das β -globulinas, uma vez que estão descritos aumentos nos seus níveis durante episódios de inflamação e infeção aguda. Estes defendem, como tal, a utilização do plasma como amostra para a realização do proteinograma (Rosenthal, 2000). Hawkey e Hart (1988) concluíram que a avaliação da concentração do Fb em conjunto com a contagem de heterófilos era um teste de triagem útil para detetar infeções em aves.

1.2.2.5 Proteínas do complemento

O sistema complemento, um dos componentes principais da imunidade inata, é uma parte importante do sistema de defesa contra a invasão de microrganismos patogênicos (Carroll, 2004). É constituído por uma série de proteínas plasmáticas, bem como recetores celulares superficiais e proteínas reguladoras que estão presentes numa grande variedade de células do organismo (Tegla *et al.*, 2011). As proteínas circulam sob a forma inativa, contudo, em resposta ao reconhecimento de componentes moleculares de microrganismos, ocorre a sua ativação sequencial, funcionando como uma cascata na qual a ligação de uma proteína promove a ligação da proteína seguinte. As atividades do complemento incluem: aumento da fagocitose (através do aumento da opsonização), aumento da resposta das células B e T, capacidade de induzir a resposta inflamatória e, finalmente, aumento da morte direta das células alvo através da lise das mesmas (Carroll, 2004). A síntese das proteínas do complemento ocorre fundamentalmente de forma constitutiva nos hepatócitos, sendo libertadas para a circulação. Os macrófagos possuem a capacidade de sintetizar os componentes iniciais C1, C2, C4 e C3 (Tegla *et al.*, 2011). Alguns dos fatores são regulados positivamente após a estimulação com citocinas pro-inflamatórias, atuando assim como APP (C3, MBL e CRP) (Eckersall, 2008). O componente C3 é o componente chave do sistema, a sua ativação por clivagem proteolítica inicia a maioria das funções biológicas do sistema complemento. Existem três vias para a ativação do complemento: a via clássica, ativada por complexos antígeno-anticorpo; a via das lectinas, ativada pela interação de carboidratos microbianos como a MBL (entre outras lectinas) e a via alternativa, ativada pela ligação da C3b à superfície de microrganismos e moléculas de anticorpos (Carroll, 2004).

1.2.2.6 Imunoglobulinas

As imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas com atividade de anticorpo que podem ser encontradas no sangue, linfa e tecidos vascularizados de todos os vertebrados mandibulados (Litman *et al.*, 1993). Estão identificadas até à data três classes de Ig nas aves: a Ig M, a Ig Y e a Ig A (Glick, 1999). No proteinograma, a maioria das Ig é encontrada na fração das γ -globulinas, que pode ser diferenciada em $\gamma 1$ e $\gamma 2$. Das imunoglobulinas descritas nas aves, a Ig M e a Ig A podem ser encontradas principalmente na região $\gamma 1$ (e em certa extensão na região $\beta 2$) e a Ig Y é encontrada principalmente na região $\gamma 2$ (Cray *et al.*, 2007; Higgins & Warr, 1993).

As Ig atuam como anticorpos, são extremamente específicas e são produzidas em resposta a antígenos. A sua produção faz parte da resposta humoral (imunidade adquirida, normalmente mais lenta que a imunidade inata), tendo os linfócitos B um papel fundamental. Estas células são encontradas principalmente na bolsa de Fabricius, podendo também ser encontradas, nos adultos, no sangue e nos centros germinativos. Os linfócitos B respondem

a um estímulo antígeno com a diferenciação e proliferação dos plasmócitos que produzem o anticorpo específico contra o antígeno estimulante (Eckersall, 2008).

A produção de anticorpos por parte dos linfócitos B evita a propagação dos agentes patogênicos ao combinar-se com o agente neutralizando-o, facilitar a absorção e digestão do patógeno pelas células fagocíticas e facilitar a lise e morte celular. A maioria das respostas que envolvem os anticorpos nas aves requer a cooperação entre os linfócitos B, T, macrófagos e células dendríticas (Glick, 1999).

Uma população específica de plasmócitos de origem genética definida, um clone, produz uma Ig específica. O crescimento descontrolado de um único clone de célula B resulta numa sobreprodução de uma única espécie química de Ig, que aparece como um pico monoclonal “afiado” ou gamopatia monoclonal no eletroferograma. Ocasionalmente, uma gamopatia biclonal ou triclinal pode ser identificada. Um grupo de clones, cada um com uma origem genética diferente, pode também provocar a síntese excessiva de uma mistura heterogênea de Ig, que aparece com uma região hiperglobulinêmica difusa ou ampla no eletroferograma. Esta região é descrita como uma gamopatia policlonal (Eckersall, 2008). As γ -globulinas (e por consequência as Ig) estão normalmente elevadas em condições crônicas (Lumeij, 2008).

1.2.2.6.1 Estrutura geral

A estrutura básica das Ig consiste em quatro cadeias polipeptídicas, duas pesadas (HC) e duas leves (LC), que formam a unidade monomérica (HC_2LC_2) (Davison, Magor & Kaspers, 2008; Glick, 1999). As Ig podem ser compostas por uma única unidade básica, como é o caso da Ig Y, ou então serem compostas por várias unidades formando um polímero, caso da Ig M e Ig A. Estas formas multiméricas contêm uma cadeia polipeptídica de ligação com um peso molecular de 15 kDa. A cadeia polipeptídica de ligação aparentemente não é essencial para a polimerização, sendo incorporada provavelmente como o resultado desta, e não como um prelúdio da associação das Ig. As cadeias H e L são formadas por domínios, cada um com cerca de 115 aminoácidos. (Davison *et al.*, 2008). Os domínios na região N-terminal das duas cadeias são altamente variáveis (DV), sendo que a associação dos domínios DV_H e DV_L dá origem ao local de ligação do antígeno ou porção Fab, que conferem a especificidade da Ig. À porção Fab irá ligar-se o epítopo (região do antígeno) dos antígenos, que pode ser composto por aminoácidos ou carboidratos. Cada monômero de Ig possui duas porções Fab. Os restantes domínios apresentam pouca variabilidade genética sendo designados de domínios constantes (DC). A cadeia HC apresenta normalmente 3 a 4 domínios, dependendo do isótipo, e a cadeia LC um isótipo. Os domínios DC na região C-terminal formam a porção Fc da Ig, responsável pelas ações do anticorpo. As propriedades biológicas estão dependentes dos domínios DC, nomeadamente a semi-vida e a iniciação das funções efectoras secundárias como a fixação do complemento e a opsonização (Glick, 1999). Uma ponte dissulfúrica formada pelos resíduos de cisteína entre

os domínios DC_L e o DC_{H1} une covalentemente as cadeias L e H, enquanto os domínios V das duas cadeia estão ligados de forma não covalente (Huang *et al.*, 2012).

As Ig estão divididas em diferentes isótipos. Esta divisão está relacionada com as cadeias HC das Ig, que possuem domínios com antigenicidade distinta, sendo cada domínio codificado por um gene distinto (Glick, 1999). As espécies aviárias descritas até à data possuem três isótipos: Ig M, Ig Y e Ig A constituídos respetivamente pelos domínios DC_μ, DC_υ e DC_α (Choi *et al.*, 2010). No que diz respeito à cadeia L, as aves expressam unicamente as cadeias LC_λ. Cada molécula de Ig utiliza apenas um isótipo de cadeia HC (Huang *et al.*, 2012).

1.2.2.6.2 Ig M

A Ig M da galinha é estruturalmente e funcionalmente homóloga à Ig M dos mamíferos. É o recetor de antígenos predominantes das células B, e durante o desenvolvimento embrionário é o primeiro isótipo a ser expresso. A Ig M da galinha apresenta um peso molecular que se encontra entre os 823 e 954 kDa, com um valor médio de 890 kDa. A cadeia HC apresenta um peso molecular de 70 kDa aproximadamente, e a LC de 22 kDa, indicando que a Ig M da galinha apresenta provavelmente uma configuração tetramérica (μ_2L_2)₄ (Davison *et al.*, 2008). Estão ainda descritas pequenas quantidades de Ig M monomérica (7S) no soro de galinhas normais (Lebacqz-Verheyden, Vaerman & Heremans, 1974). Cadeias HC livres de Ig M foram encontradas no soro de galinhas que sobreviveram ao vírus da doença de Gumboro (Ivanyi, 1975), e em galinhas a quem foi removida cirurgicamente a bolsa de Fabricius (Choi & Good, 1971).

Tal como a Ig M da galinha, a Ig M do pato apresenta grande homologia com a Ig M dos mamíferos. É um polímero com um peso molecular que varia entre os 800 kDa e os 900 kDa. A cadeia HC tem 86 kDa e a cadeia LC tem 23 a 25 kDa. A estrutura tetramérica é mais compatível com o peso molecular estimado (800 kDa) da Ig M dos patos, do que a estrutura pentamérica. A Ig M é uma componente menor do soro nos patos normais, podendo ser encontrada em concentrações inferiores a 2 mg/mL (Higgins & Warr, 1993; Magor, Warr, Bando, Middleton & Higgins, 1998).

É importante realçar que alguns autores defendem que a dimensão da Ig M, tanto de galinhas como de patos, é maior que o de uma verdadeira Ig M tetramérica, como acontece nos peixes teleósteos, e sendo assim ambas deverão ser pentaméricas (Lundqvist, Middleton, Radford, Warr & Magor 2006).

Invariavelmente, a Ig M é o principal isótipo produzido após a exposição inicial a um novo antígeno, sendo a seguir à Ig Y aquele que se encontra em maior concentração no soro. Como nos mamíferos, esta resposta é normalmente transitória, embora após infeções bacterianas crónicas, como a *Bordetella avium* em perus, a Ig M tenha sido reportada como estando ativa durante várias semanas (Davison *et al.*, 2008). O elevado número de locais de

ligação a antígenos (cerca de 8) tornam a Ig M um anticorpo eficiente na aglutinação, precipitação, opsonização, fixação do complemento e neutralização de vírus (Gershwin, 2008).

1.2.2.6.3 Ig Y (Ig G)

Estudos filogenéticos demonstraram que o homólogo aviário da Ig G dos mamíferos, apresenta semelhanças tanto com Ig G como com a Ig E dos mesmos, estando provavelmente equidistante entre as duas (Ratcliffe, 2006). Diferenças nas propriedades bioquímicas levaram Leslie e Clem (1969) a propor uma nova designação para esta Ig, Ig Y, sendo que neste momento esta nomenclatura é a mais aceita, uma vez que esta Ig aparenta ser o antecessor evolucionário da Ig G e Ig E, partilhando homologias com cada um destes isótipos dos mamíferos (Warr, Magor & Higgins, 1995). Existem contudo autores, que defendem que uma vez que esta Ig é homóloga do ponto de vista funcional relativamente à Ig G dos mamíferos o termo Ig G deverá ser mantido (Ratcliffe, 2006). No que diz respeito à sequência de aminoácidos esta Ig está mais próxima da Ig E dos mamíferos (Glick, 1999). Neste trabalho adotar-se-á a nomenclatura Ig Y.

A principal diferença entre a Ig Y e Ig G encontra-se na dimensão das cadeias HC da molécula das aves. A Ig Y é composta por cinco domínios (DV, DC1-DC4), ao passo que a Ig G é composta por 4 (DV, DC1-DC3) (Lundqvist *et al.*, 2006). A segunda diferença é que a Ig Y não possui uma região charneira geneticamente codificada, apresentando regiões junto das fronteiras dos domínios DC1-DC2 e DC3-DC4 que contêm resíduos de prolina e glicina. Estas regiões conferem uma flexibilidade limitada à molécula, sendo este grau de flexibilidade (ou inflexibilidade) relevante para as suas propriedades funcionais (Warr *et al.*, 1995).

Embora a Ig Y seja o principal anticorpo das aves ativo durante a infeção, a caracterização detalhada foi apenas realizada na galinha e no pato. A Ig Y da galinha no soro é monomérica, possuindo um peso molecular de 165-206 kDa. As cadeias u têm cerca de 67-68 kDa de peso molecular (Leslie & Clem, 1969)

Os patos possuem três formas de Ig Y: uma forma secretada com quatro domínios DC (análoga à Ig Y da galinha), uma forma recetora e uma forma fragmentada denominada Ig Y(Δ Fc) que possui apenas dois domínios DC. A denominação Ig Y(Δ Fc) deve-se ao facto desta molécula se assemelhar do ponto de vista da antigenicidade e do ponto de vista estrutural ao fragmento Fab da Ig Y. Todas estas isoformas são o produto de um único gene, sendo que o rácio Ig Y/ Ig Y(Δ Fc) no soro é de aproximadamente 3:5, no entanto, a forma fragmentada parece surgir mais tarde na resposta imune. Embora a forma completa e a forma fragmentada sejam transmitidas à descendência através da vesícula vitelina, a forma completa é aquela que é predominantemente transmitida (Lundqvist *et al.*, 2006; Warr *et al.*, 1995).

A Ig Y é o anticorpo predominante no soro (5 mg/mL), sendo produzido após a IgM na primeira resposta humoral e é o principal isótipo produzido na resposta secundária. Em termos de função a Ig Y parece combinar as duas funções que são tipicamente cumpridas separadamente pela Ig G e a Ig E nos mamíferos. Como a Ig G, a Ig Y é o principal anticorpo sistêmico, estando envolvido na fixação do complemento, aglutinação e opsonização. Como a Ig E, a Ig Y é um anticorpo sensibilizador dos tecidos, e pode estar envolvido na anafilaxia (Lundqvist *et al.*, 2006).

1.2.2.6.4 Ig A

A Ig A é o principal anticorpo encontrado nas secreções corporais. Trata-se de um polímero unido por uma cadeia polipeptídica de ligação que se liga a recetores existentes na superfície das células epiteliais dos tecidos e mucosas. Após a ligação, a Ig A interioriza o recetor que passa a denominar-se componente secretor, sendo o complexo transportado através da célula epitelial e secretado para o lúmen do órgão em questão. O componente secretor promove a adesão da Ig A à superfície da célula epitelial, e protegendo-a da degradação proteolítica no interior das células (Wieland *et al.*, 2004).

Diversos investigadores demonstraram a presença de uma forma homóloga do ponto de vista estrutural e funcional da Ig A dos mamíferos nas secreções da galinha, especialmente na bÍlis (Lebacq-Verheyden *et al.*, 1974). A clonagem da cadeia HC revelou existir uma maior semelhança estrutural desta relativamente às cadeias HC α dos mamíferos. Existem contudo algumas diferenças: a cadeia α da galinha possui quatro domínios DC e não tem charneira genética sugerindo que, como acontece no caso da Ig Y, o domínio primitivo DC_H2 pode ter sido condensado de modo a conferir uma região charneira à molécula dos mamíferos. A molécula de Ig A extraída de secreções como a bÍlis, é normalmente maior que a Ig A encontrada nas secreções dos mamíferos (nestes animais a Ig A é um dímero) colocando a hipótese que a forma aviária é um trímero ou um tetrâmero. A forma que circula no soro é possivelmente um monómero (Davison *et al.*, 2008; Glick, 1999). A Ig A apresenta um peso molecular de 170 kDa no soro, 350 kDa na bÍlis e 700 kDa nas outras secreções. A cadeia pesada apresenta um peso molecular de 65 kDa (Ratcliffe, 2006).

Nos patos está descrita uma forma de Ig A que se encontra presente na bÍlis. Esta molécula, anteriormente designada Ig X, apresenta um peso molecular de 890 kDa com cadeias HC de 75 kDa e cadeias LC com 22-24 kDa, e trata-se aparentemente de um polímero. A estrutura do polímero é desconhecida, contudo uma estrutura tetramérica é plausível. Tal como a molécula da galinha também apresenta quatro domínios DC. A clonagem molecular desta Ig demonstrou que se trata de um verdadeiro homólogo da Ig A, tendo também sido identificados os genes que codificam o recetor celular desta Ig, bem como aqueles que codificam a cadeia polipeptídica de ligação. A expressão da Ig A na pós-eclosão nos patos

está atrasada em termos de ontogenia quando comparada com as galinhas, podendo este facto ter impacto na imunidade dos patos (Lundqvist *et al.*, 2006; Magor *et al.*, 1998).

A concentração da Ig A é de cerca de 0.3 mg/mL no soro e 2-3 mg/mL na bÍlis (Ratcliffe, 2006). A Ig A é o anticorpo que estÁ envolvido nas funçÓes de defesa na superfÍcie corporal e alÉm desta, podendo ser encontrado nas secreçÓes respiratórias, reprodutivas e gastrointestinais (incluindo na bÍlis onde se encontra em grande concentraçÓe) (Lundqvist *et al.*, 2006). A presença deste anticorpo nas secreçÓes das mucosas dos tratos respiratórios, reprodutores e gastrointestinais assume especial importÁncia, uma vez que a maioria dos patogénios invade o organismo através das superfÍcies mucosas destes tratos (Wieland *et al.*, 2004).

1.3 InterpretaçÓe do proteinograma

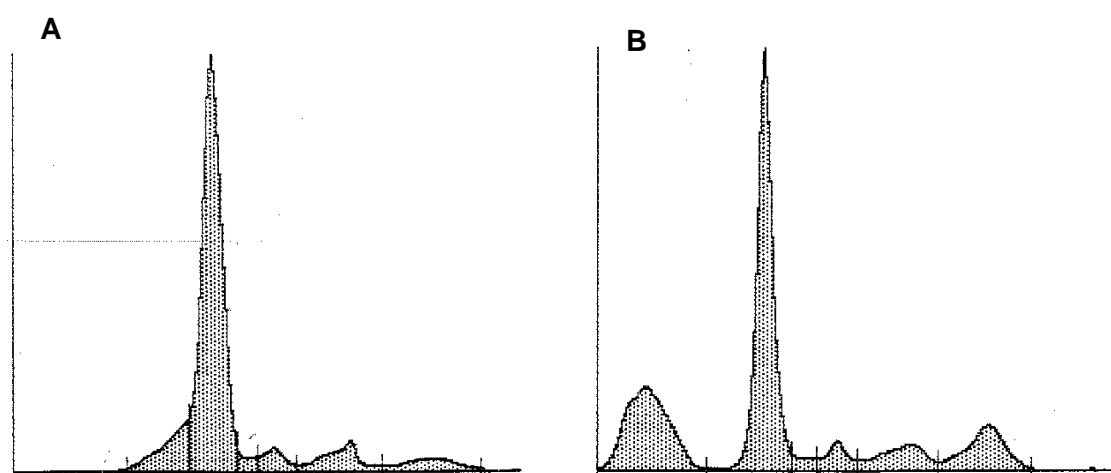
1.3.1 Eletroferograma normal nas aves

O eletroferograma nas aves é normalmente composto por cinco fraçÓes. Estas fraçÓes incluem a albumina, as α_1 -, as α_2 -, as β - e as γ -globulinas. As α e β -globulinas (incluindo o fibrinogénio) sÁo consideradas APP, enquanto a fraçÓe γ , como jÁ foi referido anteriormente, é essencialmente constituída pelas imunoglobulinas. Como também jÁ foi referido anteriormente, muitas vezes é possÍvel identificar uma sexta fraçÓe proteica: a TTR (também denominada pré-albumina). De modo a auxiliar na interpretaçÓe dos resultados do proteinograma, um rácio albumina/globulinas (A/G) é calculado a partir das concentraçÓes proteicas através da seguinte fórmula: $(\text{pré-albumina} + \text{albumina}) / (\alpha_1 + \alpha_2 + \beta + \gamma\text{-globulinas})$ (Lumeij, 2008). O A/G possui maior significado clÍnico que a concentraçÓe de PT, uma vez que muitas vezes em condiçÓes inflamatÓrias agudas ou crÓnicas ocorre uma diminuiçÓe da concentraçÓe da albumina com um aumento concomitante das fraçÓes das globulinas, o que se traduz numa diminuiçÓe do A/G, podendo a concentraçÓe de PT manter-se dentro dos valores normais (Hochleithner, 1994; Lumeij, 2008).

As α -globulinas sÁo divididas em duas fraçÓes (α_1 e α_2 -globulinas) pela eletroforese e representam geralmente apenas 4-8 % da concentraçÓe proteica total. Num eletroferograma normal de uma ave, as α_1 -globulinas normalmente nÁo sÁo facilmente identificÁveis, uma vez que um pico claramente demarcado nÁo é visÍvel. As α_2 -globulinas sÁo geralmente representadas como uma fraçÓe Única. A fraçÓe das β - globulinas, na maioria das espécies de psitacídeos, é representada por um pico duplo. Este traçado eletroforético é frequentemente observado nos Papagaios cinzentos (*Psittacus erithacus*), nos quais as β -globulinas constituem 12-20 % da concentraçÓe proteica total. As γ -globulinas representam aproximadamente 10 % da concentraçÓe proteica total, podendo ser divididas em duas fraçÓes nos mamíferos. Porém, nas aves originam normalmente um Único pico no traçado eletroforético. Traçados eletroforéticos normais para uma Cacatua (*Cacatua sp*) e uma Caturra (*Nymphicus hollandicus*) encontram-se representados nas Figuras 4 A) e 4 B),

respetivamente (Cray & Tatum, 1998). Embora os valores apresentados anteriormente possam ser considerados valores de referência para as aves, é importante salientar que existe uma grande variabilidade nestes valores, como se pode constatar na Tabela 8 – Anexo III, de espécie para espécie, sendo por isso importante interpretar os valores obtidos de acordo com o intervalo de referência para a espécie em causa, se este existir (Cray *et al.*, 2007).

Figura 4. Traçado eletroforético normal de uma A) Cacatua (*Cacatua sp*) e de uma B) Caturra (*Nymphicus hollandicus*) Adaptado de Cray e Tatum (1998)



A) Da esquerda para a direita as frações são Pré-albumina, albumina, α 1-globulinas, α 2-globulinas, β -globulinas e γ -globulinas B) Da esquerda para a direita as frações são Pré-albumina, albumina, α 1-globulinas, α 2-globulinas, β -globulinas e γ -globulinas

1.3.2 Disproteínemias

1.3.2.1 Hipoproteínemia

A hipoproteínemia em aves está frequentemente associada a hipoalbuminémia e a um A/G diminuído (Campbell, 2006). Um valor baixo de albumina pode resultar de uma diminuição da sua produção no fígado (como acontece em casos de doença hepática crónica grave ou em casos de má nutrição), aumento da sua perda através dos sistemas gastrointestinal e urinário (devido a doença renal), parasitismo, ou ainda devido à sua maior utilização, como acontece em períodos prolongados de jejum (Campbell, 2006; Fudge & Speer, 2001). A hipoalbuminémia associada a valores normais das frações α , β , e γ das globulinas está normalmente relacionada com problemas degenerativos ou de manejo. Este padrão pode também ser causado por processos inflamatórios ou infecciosos crónicos que não tenham induzido uma resposta imune, embora estes sejam pouco comuns. Duas doenças infecciosas que podem causar este padrão incluem a infeção por micobactérias e a doença de dilatação do proventrículo (Rosenthal, 2000). Síndromes de má absorção intestinal e má digestão também podem causar hipoalbuminémia em aves.

A hipoproteinémia pode ainda ser o resultado de perda proteica severa, como acontece nas hemorragias externas graves, doenças renais com proteinúria crónica, enteropatias com perda de proteínas (por exemplo parasitismo intestinal e enterite bacteriana) ou hepatopatias crónicas. A hiperhidratação durante a fluidoterapia pode originar uma hipoproteinémia aparente (Campbell, 2006).

1.3.2.2 Hiperproteinémia

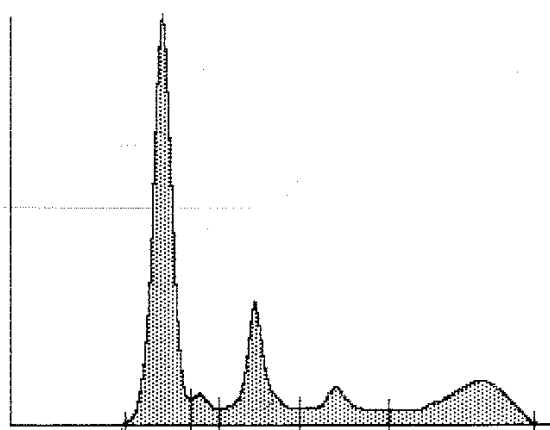
De acordo com Campbell (2006), a hiperproteinémia na maioria das espécies de aves é indicada por concentração plasmática de PT superior a 4,5 g/dL. A hiperproteinémia é normalmente o resultado de desidratação, infeção e/ou inflamação aguda ou crónica, ou ainda uma condição pré-ovulatória nas aves. O aumento da albumina e globulinas com A/G normal está normalmente associado a desidratação. A hiperproteinémia associada a hiperalbuminémia e hipoglobulinémia resulta numa relação A/G aumentada sugerindo também desidratação. Animais sujeitos a stresse crónico ou outras condições imunossupressoras podem demonstrar também este traçado eletroforético (Campbell, 2006).

A hiperproteinémia associada a hipoalbuminémia e hiperglobulinémia origina uma relação A/G diminuída e está frequentemente relacionada com a presença de doenças infecciosas crónicas. Estas incluem a clamidiose, a aspergilose, a tuberculose e ainda a peritonite ovo-induzida (Cray & Tatum, 1998; Lumeij, 1987).

Uma relação A/G diminuída associada a um valor normal de PT tem origem numa diminuição da concentração de albumina e num aumento da concentração das globulinas, especialmente das γ -globulinas, durante alterações crónicas (Hochleithner, 1994). A hiperproteinémia conjugada com um valor normal de albumina e hiperglobulinémia é sugestiva de doenças inflamatórias agudas ou condições pré-ovulatórias em aves. Normalmente os padrões eletroforéticos demonstram elevações nas α e β -globulinas, embora o aumento da concentração das γ -globulinas também possa ser observado em animais nestas condições (Campbell, 2006).

1.3.2.3 Aumento das α -globulinas

O aumento desta fração está normalmente relacionada com a presença de processos agudos (Fudge & Speer, 2001). Em algumas aves com nefrite grave ou doença renal generalizada, um aumento pronunciado da fração α_2 pode ser observado (Figura 5). Aumentos da fração α_1 (especialmente devidos ao aumento α_1 -antitripsina), com ou sem decréscimos concomitantes da albumina, foram observados em psitacídeos com infeções parasitárias (Cray & Tatum, 1998).



Aumento acentuado da fração α_2 das globulinas

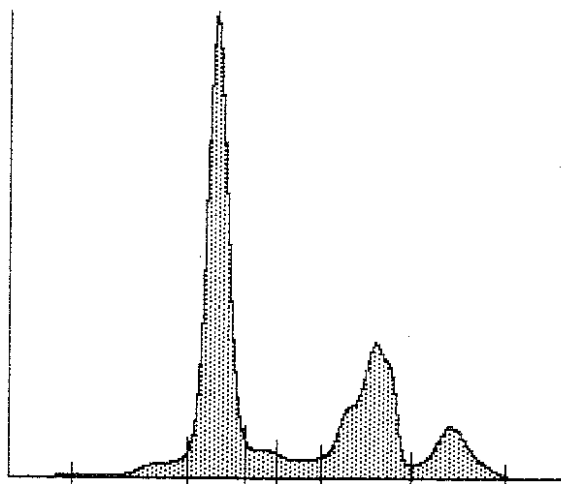
1.3.2.4 Aumento das β -globulinas

O aumento isolado da fração β das globulinas está normalmente relacionado com a presença de um processo inflamatório ou infeccioso agudo. Como referido anteriormente, o Fb está incluído na fração β das globulinas, sendo porventura a proteína mais importante do ponto de vista clínico deste grupo, sendo que o seu aumento associado a uma concentração normal de anticorpos (γ -globulinas) sugere, então, o carácter agudo da inflamação ou infeção (Fudge & Speer, 2001; Rosenthal, 2000). Este padrão é normalmente acompanhado por um aumento do número de leucócitos, embora não exclusivamente. A etiologia (viral, bacteriana, fúngica, ou até não infecciosa) não pode ser determinada pelo aumento da secção β , este padrão indica apenas que uma infeção e/ou inflamação está presente (Rosenthal, 2000).

Aumentos moderados na fração β das globulinas foram observados em aproximadamente 30 % dos casos de aspergilose e outras doenças micóticas (Figura 6) (Cray & Tatum, 1998). Num estudo clínico realizado por Cray *et al.* (2009b) em 12 casos de infeções fúngicas, tendo sido confirmada a infeção por *Aspergillus spp.* por PCR, diagnóstico histológico e cultura fúngica foram descritas, em 11 desses casos, alterações eletroforéticas caracterizadas especialmente pelo aumento da fração β em 8 das 12 aves em estudo. As alterações nesta fração são dramáticas em aves com doenças agudas, enquanto em animais com infeções crónicas a resposta inflamatória aparenta ser anérgica. Algumas aves com aspergilose são anérgicas ou encontram-se imunodeprimidas e frequentemente não produzem níveis significativos de anticorpos contra o *Aspergillus spp.* No entanto, um aumento das β -globulinas, com dados clínicos compatíveis, suporta o diagnóstico de aspergilose. Aumentos nas frações β ou γ foram observados em aves com micobacterioses. Uma hiperbetaglobulinémia ligeira a moderada associada a um decréscimo também ligeiro a

moderado na concentração de albumina está descrita em animais com hepatite e nefrite, devido em grande parte ao aumento da concentração de transferrina (Cray & Tatum, 1998)

Figura 6. Papagaio da Amazônia (*Amazona sp*) com aspergilose Adaptado de Cray e Tatum (1998)



Aumento moderado da fração β das globulinas

1.3.2.5 Aumento das α e β -globulinas

O aumento concomitante das frações α (quer seja a fração α_1 , α_2 ou as duas) e β pode ser indicativo da presença de uma infecção ou inflamação aguda severa (Rosenthal, 2000). Exemplos de alterações que podem provocar este traçado eletroforético incluem: nefrite aguda, hepatite ativa severa e síndrome nefrótica (Hochleithner, 1994). Este padrão pode também estar associado a atividade reprodutiva normal em fêmeas, mesmo na ausência de postura de ovos (Fudge & Speer, 2001; Rosenthal, 2000).

1.3.2.6 Aumento das γ -globulinas

Como referido anteriormente, esta fração é essencialmente constituída por imunoglobulinas, sendo que um aumento desta fração está relacionado normalmente com processos infecciosos ou inflamatórios crónicos. Acredita-se que o seu aumento ocorre de forma mais consistente nas infeções ou inflamações crónicas que o aumento das β -globulinas (Fudge & Speer, 2001). Na realidade, o aumento da fração γ apenas diz ao clínico que o sistema imunitário da ave respondeu a um estímulo antigénico. Contudo, normalmente representa uma resposta humoral a um processo infeccioso (Rosenthal, 2000). Causas infecciosas comuns para um aumento das γ -globulinas incluem a clamidiose e a aspergilose, embora as gamopatias não sejam específicas de doenças infecciosas, incluindo as doenças atrás mencionadas (Fudge & Speer, 2001). Quando possível deverão ser realizados testes serológicos de modo a pesquisar a presença de anticorpos específicos para a aspergilose e clamidiose. De facto, seria altamente incomum ter um teste serológico positivo para a

clamídia e uma secção γ normal (Rosenthal, 2000). Tal como acontece nos pequenos animais e humanos, aumentos monoclonais da fração γ estão descritos em aves com mieloma (Cray & Tatum, 1998). A hepatite crónica é outra possível causa para este padrão eletroforético (Hochleithner, 1994).

1.3.2.7 Aumento das α e γ -globulinas

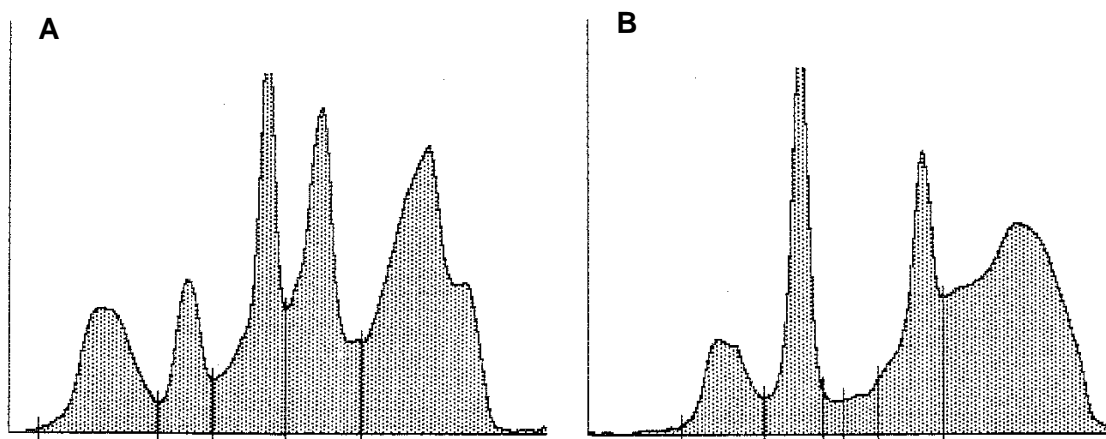
Num estudo realizado em Grouse (*Gruidae*) com reações de hipersensibilidade à mordida de inseto, Hartup e Schroeder (2006) detetaram elevações nas secções α e γ . O aumento concorrente das APP (fração α) e γ -globulinas nos grouse sugere que uma resposta inflamatória ativa associada a uma estimulação imunitária com produção de anticorpos tomou lugar. A ausência de alterações na fração β poderá ter-se devido ao tipo de amostra utilizado, o soro, que como já foi referido anteriormente não possui fibrinogénio, umas das proteínas mais importantes da fração β nas aves.

1.3.2.8 Aumento das β e γ -globulinas

O aumento concorrente das frações β e γ pode estar associado a inflamações ou infeções crónicas ativas, ou ainda a uma infeção ou inflamação aguda num animal que padece de uma doença crónica (Rosenthal, 2000). A doença inflamatória crónica que mais frequentemente produz este padrão eletroforético é a clamidiose, embora estas alterações não sejam específicas ou diagnósticas desta doença por si só (Fudge & Speer, 2001). Períodos de agudização da clamidiose produzem um padrão eletroforético bastante característico (Figura 7 A)). As alterações incluem um decréscimo moderado da albumina, um aumento ligeiro a moderado da fração β e um aumento moderado a acentuado da fração γ . O decréscimo da albumina associado à hiperglobulinémia conduz a um decréscimo acentuado no A/G (Cray & Tatum, 1998). Esta doença, e outras doenças crónicas ativas, podem ainda produzir uma elevação de uma ou das duas frações α em conjunto com as frações γ e β , ou ainda um aumento das frações α com a fração γ sem elevação da fração β (Rosenthal, 2000). As aves com clamidiose crónica podem não apresentar alterações a nível das proteínas inflamatórias (apenas a fração γ encontra-se alterada), ou apresentar apenas uma ligeira hiperbetaglobulinémia. Os testes serológicos para a clamidiose nem sempre geram diagnósticos definitivos. Nestes casos o proteinograma pode auxiliar na interpretação dos resultados serológicos. O primeiro isótipo dos anticorpos a ser detetados pelos testes de imunofluorescência para a *Chlamydia* crê-se ser a Ig Y. Uma vez que este isótipo é produzido mais tarde durante a resposta humoral, durante períodos de infeção aguda (inferiores a duas semanas), os resultados serológicos em animais infetados são frequentemente negativos, ao passo que o eletroferograma é anormal (Figura 7 A)). Após o tratamento, também é frequente as aves apresentarem resultados serológicos positivos (uma vez que os anticorpos mantêm-se em circulação) associados a um traçado

eletroforético normal, que evidencia a eliminação dos organismos de *Chlamydia*. Estão também descritos aumentos moderados das frações β e γ em animais infetados por *Sarcocystis*. Tal como na clamidiose o proteinograma pode auxiliar no diagnóstico da sarcocistose. Estudos realizados em aves infetadas de forma natural ou experimental por *Sarcocystis* revelaram que os animais frequentemente apresentavam alterações nas frações β e γ e ao mesmo tempo os resultados dos testes serológicos eram negativos. Os dois exemplos acima referidos demonstram a utilidade do proteinograma. Alterações no padrão eletroforético interpretadas em conjunto com dados clínicos podem auxiliar o clínico no diagnóstico de doenças (Cray & Tatum, 1998). A hepatite crónica ativa origina frequentemente um aumento ligeiro a moderado na fração β , com um aumento semelhante na fração γ . O aumento das APP em conjunto com o aumento das Ig (especialmente a Ig M e Ig A) leva a que as duas frações se unam tornando difícil a distinção entre as duas frações (Figura 7 B)) (Lumeij & Overduin, 1990).

Figura 7. Traçado eletroforético de A) clamidiose aguda e B) hepatite bacteriana numa *Cacatua* (*Cacatua sp*) Adaptado de Cray e Tatum (1998)



A) Acentuada diminuição da albumina e aumento acentuado das frações α_2 , β e γ

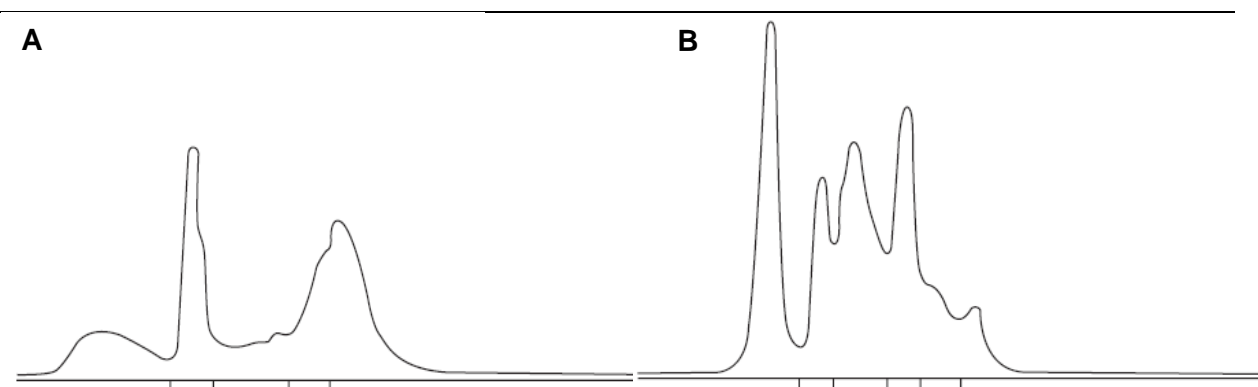
B) Aumento das frações β e γ e união entre as duas

1.3.2.9 Aumento das α , β e γ -globulinas e diminuição da albumina

Este padrão pode representar uma infeção ou inflamação crónica ativa grave. Este padrão pode ser produzido pelas doenças atrás referidas (aspergilose, clamidiose, sarcocistose e ainda alterações hepáticas). Este traçado eletroforético pode ainda representar uma infeção ou inflamação aguda grave numa ave com uma doença crónica. A conjugação de uma concentração baixa de albumina com um decréscimo das globulinas é uma forte evidência de estarmos perante um processo crónico, debilitante e em curso, que requer tratamento de suporte imediato de modo a garantir a sobrevivência do animal (Rosenthal, 2000). As doenças hepáticas são as causas mais frequentes deste padrão, nomeadamente a cirrose

hepática (Figura 8 A)). A hipoalbuminémia associada à hiperglobulinémia origina uma relação A/G diminuída. Este padrão também é encontrado em casos de aves com peritonites ovo-induzidas (Figura 8 B)) (Lumeij, 1987). Aparentemente é necessário que uma doença grave esteja presente para que exista uma elevação de todas as frações das globulinas ao mesmo tempo (Rosenthal, 2000).

Figura 8. Traçado eletroforético de A) cirrose hepática num Papagaio da Amazônia (*Amazona sp*) e de B) peritonite ovo-induzida numa Ema (*Dromiceius novaehollandiae*) Adaptado de Lumeij (1987)



A) Diminuição da albumina e aumento das globulinas B) Diminuição da albumina e aumento das globulinas

1.3.2.10 Aumento das γ -globulinas e diminuição da albumina

Este padrão pode representar uma infecção ou inflamação crônica. O valor baixo da albumina conjugado com uma elevação na secção γ é uma forte evidência de um processo crônico debilitante (Rosenthal, 2000).

1.3.3 Proteinograma em aves de rapina

Os estudos realizados até à data em várias espécies de aves de rapina demonstraram que existem diferenças consideráveis no que diz respeito ao seu padrão eletroforético normal, quando comparado com outras espécies de aves, em particular os psitacídeos. De uma forma geral nas rapinas as α 1-globulinas são uma fração de grande amplitude que se ramifica a partir da albumina (Figura 9 A) e 9 B)). As concentrações das α 1-globulinas podem atingir 1,08 g/dL, ou 27 % da concentração de PT. As concentrações das α 2 e β -globulinas tendem também a ser significativamente mais altas nas aves de rapina que nas outras espécies de aves, com as concentrações máximas de referência a atingirem 0,9 g/dL (16 %) e 1,9 g/dL (30 %), respetivamente. A concentração das γ -globulinas encontra-se dentro do intervalo de referência típico para as outras espécies de aves (Cray & Tatum, 1998). Tatum *et al.* (2000) obtiveram valores semelhantes num estudo realizado em diversas aves de rapina. No mesmo estudo, foram obtidos para a maioria de espécies de rapinas valores de pré-albumina baixos ou mesmo negligenciáveis, quando comparados com as

espécies de psitacídeos. Lanzas *et al.* (2001), num estudo realizado com crias de Falcões-peregrinos (*Falco peregrinus*) selvagens, concluíram que os valores eletroforéticos apresentados por estes iam de encontro aos atrás mencionados. O valor da pré-albumina neste estudo foi de cerca de 19,5 % da concentração de PT. Trabalhos realizados por Gelli *et al.* (2009) em Águias-de-asa-redonda (*Buteo buteo*) relataram uma fração de pré-albumina baixa ou mesmo negligenciável, uma fração α de grande amplitude, tendo os valores de β -globulinas sido ligeiramente mais baixos que aqueles descritos por Tatum *et al.* (2000) para as outras espécies de aves de rapina. Isto poderá ter-se devido ao tipo de amostra utilizado (soro).

As disproteinémias apresentadas pelas aves de rapina são semelhantes às disproteinémias apresentadas pelos psitacídeos afetados por doenças infecciosas e não infecciosas. Nestas situações o padrão eletroforético caracteriza-se por uma concentração normal, baixa ou alta de PT, com um A/G invertido e vários tipos de aumentos policlonais das frações das globulinas. De acordo com a fase da clamidiose o traçado eletroforético pode revelar uma A/G fortemente invertida, em casos de clamidiose aguda (Figura 10 A)), ou então um aumento ligeiro a moderado na secção α ou β das globulinas com uma concentração de albumina normal ou baixa, em casos crónicos ou em processo de resolução. Rapinas com aspergilose apresentam a fração de albumina normal com uma hiperbetaglobulinémia moderada a acentuada (Figura 10 B)). Lesões e infeções locais, toxicoses, e doenças ou condições clínicas não específicas, produzem um padrão eletroforético caracterizado por um ligeiro aumento das frações α_2 , β e γ das globulinas (Cray & Tatum, 1998).

A análise eletroforética já demonstrou ser importante para o diagnóstico de clamidiose e aspergilose em rapinas. Um teste serológico positivo para *Chlamydia*, não indica necessariamente a presença de uma infeção ativa, uma vez que as aves permanecem seropositivas até um ano após a infeção. Um padrão eletroforético indicativo de clamidiose aguda ou clamidiose crónica/em resolução suporta as suspeitas clínicas e hematológicas de infeção ativa apesar das evidências serológicas. Uma disproteinémia marcada representada por alterações dramáticas no eletroferograma pode suportar o diagnóstico clínico de aspergilose, mesmo em casos em que a titulação de anticorpos tenha sido negativa (Tatum *et al.*, 2000).

Figura 9. Padrões eletroforéticos normais de um A) Falcão-peregrino (*Falco peregrinus*) e de uma B) Águia-de-cabeça-branca (*Haliaeetus leucocephalus*) Adaptado de Tatum *et al.* (2000)

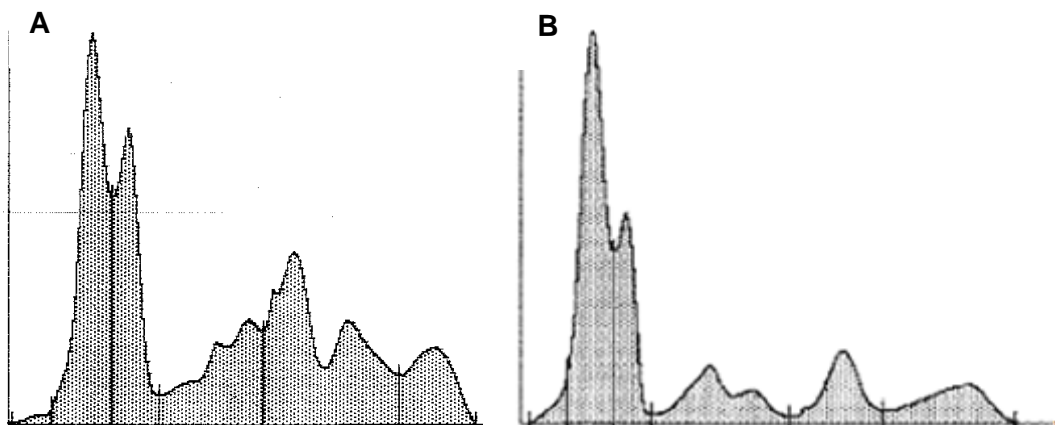
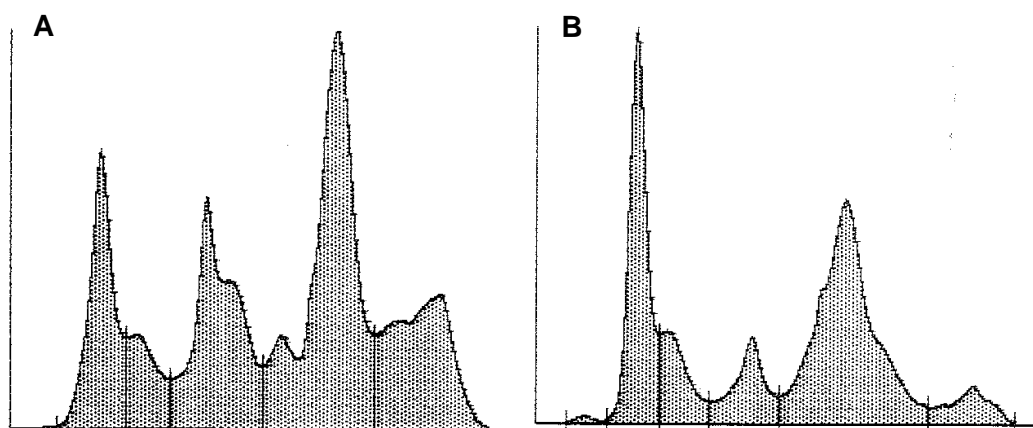


Figura 10. Traçado eletroforético de A) clamidiose aguda num Búteo-de-cauda-vermelha (*Buteo jamaicensis*) e de B) aspergilose num Bufo da Virgínia (*Bubo virginianus*) Adaptado de Cray & Tatum (1998)



A) Diminuição da albumina e aumento das frações α_2 , β e γ das globulinas. A pré-albumina não está presente B) Aumento moderado a acentuado da fração β das globulinas

1.3.4 Influências fisiológicas no traçado eletroforético

Os fatores fisiológicos que podem alterar a concentração proteica e por consequência afetar os resultados eletroforéticos incluem: o sexo, a idade, o nível proteico da dieta, o stresse térmico, a época de mudança da plumagem, o estado de hidratação e o estado reprodutivo da ave (Hochleithner, 1994).

De forma geral as aves juvenis (com menos de 8 meses) apresentam uma concentração de PT, inferior à dos adultos (Cray *et al.*, 2007). O valor mais baixo de PT em aves jovens está relacionado com uma menor concentração de γ -globulinas (anticorpos) (van Wyk, van der Bank & Verdoorn, 1998), e com níveis mais baixos de albumina e outras proteínas, devido

ao aumento da exigência tecidual em proteínas e aminoácidos durante o crescimento (Villegas, Sánchez, Costillo & Corbacho, 2002). À medida que se dá o crescimento da ave e a estimulação do seu sistema imunitário, ocorre um aumento das concentrações de albumina, γ -globulinas e PT. Em aves mais velhas ocorre um decréscimo da concentração de albumina, o que sugere que as concentrações iniciais elevadas estão relacionadas com o rápido crescimento e/ou manutenção de uma reserva proteica elevada na altura em que a jovem ave abandona o ninho. Já as concentrações de PT e globulinas irão continuar a aumentar (Lanzarot, Barahona, San Andrés, Fernández-García & Rodríguez, 2005; van Wyk *et al.*, 1998).

No que diz respeito ao sexo dos animais, as fêmeas apresentam tendencialmente uma concentração proteica superior aos machos. Esta diferença é mais marcada durante a época reprodutiva. Durante este período ocorre um aumento significativo da concentração de PT imediatamente antes da postura do ovo. Este aumento está relacionado com uma elevação, induzida pelo estrogénio, das globulinas, em particular das α e β -globulinas. São constituintes destas frações, proteínas que são as precursoras do vitelo (nomeadamente a vitelogenina e as lipoproteínas) e que são sintetizadas no fígado e transportadas através do plasma até ao ovário, onde são incorporadas no oócito (Lumeij, 1987; van Wyk *et al.*, 1998). As proteínas plasmáticas desempenham ainda um papel importante como transportadoras do cálcio, existindo relatos do seu aumento aquando da reabsorção óssea do cálcio na mineralização da casca do ovo (Spagnolo, Crippa, Marzia & Sartorell, 2006). Tal como o estrogénio, a testosterona e a hormona do crescimento aumentam a concentração de PT nas aves, contrariamente à T4 que provoca a diminuição da concentração de PT (Hochleithner, 1994).

A época da mudança da plumagem é um período de elevado consumo proteico. As penas são compostas por cerca de 95 % de proteínas, sendo que a perda e regeneração das mesmas ocorre num período de algumas semanas a alguns meses, estando este período associado a uma síntese e transporte proteico elevado (Roman *et al.*, 2009b). Resultados de um estudo conduzido em Patos-reais (*Anas platyrhynchos*) demonstraram alterações na concentração de albumina e α 2-globulinas e PT. Verificou-se uma diminuição significativa da concentração de PT, ocorrendo o valor mínimo durante a muda, seguido de um aumento na sua concentração. Já as concentrações da albumina e α 2-globulinas apresentaram um valor mais baixo durante a muda do que daí para diante (Driver, 1981). Noutro estudo, realizado com Gansos-de-cabeça-listada (*Anser indicus*) verificou-se que a época de muda coincidia com o decréscimo na concentração de PT, albumina, α 2, β e γ -globulinas, seguido por um aumento na concentração de PT, albumina, α 2, β e γ -globulinas uma vez que a muda terminou. A concentração de pré-albumina esteve aumentada durante a muda, enquanto a fração α 1 foi mais elevada durante a época de muda, do que antes ou depois desta (Roman *et al.*, 2009b).

Embora as proteínas plasmáticas sejam sensíveis a influências nutricionais, as alterações que a dieta produz na concentração de PT são frequentemente subtis e difíceis de detetar ou interpretar (Hochleithner, 1994). Em avestruzes (*Struthio camelus*) alimentadas com uma dieta altamente proteica, foram encontrados aumentos na fração α e diminuições na concentração da fração γ das globulinas (Polat, Cetin, Ak & Balci, 2004). Em galinhas alimentadas com uma dieta de alto teor proteico verificou-se um aumento da concentração de PT. Este aumento esteve relacionado com um incremento na concentração de albumina (Leveille & Sauberlich, 1961). Como referido anteriormente, animais desidratados apresentam níveis de PT superiores.

O stresse térmico (hipertermia ou hipotermia) está associado a perda de nitrogénio, aumento da atividade adrenal e aumento da degradação proteica, resultando numa diminuição das PT. A hipertermia e a hipotermia causam uma diminuição das PT e albumina, podendo também estar associadas a um aumento da fração α_2 das globulinas que está relacionado com a APR. Achados semelhantes são observados após fraturas ósseas e cirurgias extensas (Hochleithner, 1994).

1.3.5 Influências artefactuais no traçado eletroforético

1.3.5.1 Hemólise

A hemólise é um fator importante a ter em conta aquando da análise eletroforética, uma vez que a presença desta nas amostras a analisar causa alterações nos resultados finais quer da concentração de PT, quer da concentração das diferentes frações de globulinas. A magnitude destas alterações está relacionada com o grau de hemólise da amostra, do aparelho de análise e método utilizado, e ainda da espécie em causa (Roman *et al.*, 2009a). As alterações artefactuais dos resultados eletroforéticos têm origem na libertação de hemoglobina e outros componentes intracelulares a partir dos eritrócitos. A libertação de Hb confere, normalmente, uma coloração avermelhada característica ao plasma ou soro (Lippi, Salvagno, Montagnana, Brocco & Guidi, 2006), e é um fenómeno comum em medicina veterinária (Andreasen, Andreasen, Sonn & Robeson, 1996). Em aves a hemólise *in vivo* é relativamente rara (0.3 % das amostras), podendo acontecer como resultado de uma intoxicação aguda por chumbo, ou devido à ingestão de crude por aves costeiras. A hemólise *in vitro* é mais comum em aves, existindo relatos de que afeta cerca de 4.25 % das amostras submetidas para análise (Fudge, 2000). A presença de hemólise nas amostras está relacionada fundamentalmente com o maneio impróprio das mesmas. A utilização de agulhas de *gauge* demasiado elevado durante a recolha de sangue, um intervalo de tempo demasiado grande entre a recolha da amostra e a centrifugação, ou a excessiva agitação da amostra aquando da mistura desta com o anticoagulante, são fatores que contribuem para a presença de hemólise nas amostras sanguíneas recolhidas (Roman *et al.*, 2009a).

Em aves, a hemólise conduz a concentrações artificialmente elevadas de PT plasmáticas ou séricas (Andreasen *et al.*, 1996; Cray *et al.*, 2007; Roman *et al.*, 2009a). No que diz respeito aos resultados eletroforéticos, as alterações encontradas variam consoante a espécie. Em psitacídeos foi descrito um aumento artificial na fração γ das globulinas devido à presença de hemólise na amostra (Cray *et al.*, 2007). Num estudo realizado com Gansos-de-cabeça-listada (*Anser indicus*) e Milhafres-pretos (*Milvus migrans*), foram relatados valores mais elevados de γ -globulinas nas amostras onde tinha ocorrido hemólise. Este aumento artificial da fração γ pode levar a um diagnóstico incorreto por parte do clínico, uma vez que este traçado eletroforético é característico de processos inflamatórios crónicos. No mesmo estudo foram descritos, para as duas espécies, valores mais baixos de albumina nas amostras hemolisadas. Este valor mais baixo de albumina conjugado com o valor mais alto das γ -globulinas conduziu a uma diminuição do A/G. A hemólise resultou ainda, num valor mais alto da fração β e num valor mais baixo da fração α_1 dos Milhafres-pretos (Roman *et al.*, 2009a).

1.3.5.2 Refrigeração, congelação e lipémia

Trabalhos realizados por Cray *et al.* (2007) determinaram que a congelação e refrigeração (por um período inferior a 48 horas) das amostras não produzem efeitos significativos nos resultados eletroforéticos. Os mesmos autores chegaram à conclusão que um único ciclo de congelação e descongelação era preferível à refrigeração prolongada da amostra, uma vez que esta provocou alterações significativas no A/G. Estas descobertas estão de acordo com as recomendações para o manuseio de amostras destinadas a análises bioquímicas clínicas (Weiser, 2004).

Cray *et al.* (2007) também investigaram a influência da lipémia na determinação dos padrões eletroforéticos. Estes autores chegaram à conclusão que as amostras lipémicas apresentavam um valor mais elevado da fração β das globulinas, o que provocava uma diminuição artificial do A/G (Cray *et al.*, 2007).

1.4 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi obter os valores preliminares de referência de proteínas totais e das suas diferentes frações eletroforéticas (albumina, α 1-globulinas, α 2-globulinas, β -globulinas e γ -globulinas) em indivíduos da espécie *Aegypius monachus* e da espécie *Gyps fulvus*. Foi também objetivo deste trabalho estudar a influência das variáveis sexo, idade e proveniência nos resultados obtidos na espécie *Aegypius monachus*, e ainda a influência das variáveis idade e proveniência nos resultados obtidos na espécie *Gyps fulvus*.

Adicionalmente, pretendeu-se realizar uma comparação entre a refratometria e o método do biureto na determinação de proteínas totais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra

2.1.1 Abutre-preto

Durante o mês de outubro de 2011 foram colhidas e analisadas 10 amostras sanguíneas de aves ($n=10$) pertencentes à espécie abutre-preto (*Aegypius monachus*), que ingressaram ou residiam no GREFA (40° 28'06.37 N, 3° 50'25.87 O, Madrid, Espanha). A amostragem é constituída por 7 machos e 3 fêmeas. Relativamente à variável idade, os animais foram agrupados em duas classes: juvenis (entre 6 a 8 meses de idade) e adultos (com mais de 4 anos de idade), sendo a amostra composta por 2 juvenis e 8 adultos. No que diz respeito à proveniência dos animais estes foram divididos em dois grupos: selvagens (há menos de 3 meses no centro) e cativos (há mais de 4 anos no centro), sendo a amostra constituída por 4 animais selvagens e 6 animais provenientes de cativeiro. As aves classificadas como selvagens são originárias da província de Cáceres, ao passo que as aves residentes no GREFA (40° 28'06.37 N, 3° 50'25.87 O, Madrid, Espanha) são aves irrecuperáveis que integram projetos de educação ambiental geridos pelo centro.

Os animais pertencentes à espécie abutre-preto que foram incluídos neste estudo foram considerados aparentemente saudáveis após terem sido sujeitos a um exame físico, e não apresentaram alterações nas análises hematológicas e bioquímicas realizadas.

2.1.2 Grifo

Durante o mês de Outubro de 2011 foram colhidas e analisadas 11 amostras sanguíneas de animais ($n=11$) pertencentes à espécie grifo (*Gyps fulvus*), que ingressaram ou residiam no GREFA (40° 28'06.37 N, 3° 50'25.87 O, Madrid, Espanha). Relativamente à variável idade e estado (selvagem e cativeiro) os animais foram agrupados da forma que já foi descrita para os abutres-pretos, sendo a amostra composta por 10 juvenis selvagens e um adulto cativo. As aves classificadas como selvagens são originárias de colónias existentes na comunidade

de Madrid. O animal proveniente de cativeiro trata-se de um espécimen irrecuperável que é residente no centro. O sexo de cada indivíduo é desconhecido devido a não haver dimorfismo sexual nesta espécie, não tendo sido realizada sexagem.

2.2 Colheita das amostras de sangue

A colheita das amostras sanguíneas foi realizada sempre no mesmo horário (entre as 10 e as 11 horas da manhã) de modo a evitar as alterações fisiológicas provocadas pelo ritmo circadiano. De forma a minimizar a influência do fator stresse nos resultados, a colheita de sangue foi realizada antes de se iniciar o exame físico. Todos os animais estavam em jejum à cerca de 24 h. Dependendo do operador, o sangue foi colhido da veia ulnar superficial ou da veia metatarsal medial com uma agulha (Pic indolor®, Artsana, Grandate, Itália) de 23 *gauge* acoplada a uma seringa (Pic indolor®, Artsana, Grandate, Itália) de 2,5 mL. Após a colheita ter sido realizada uma gota de sangue foi colocada numa lâmina para a realização de um esfregaço por esgotamento, foram preenchidos $\frac{3}{4}$ de um tubo de microhematócrito heparinizado (code 7301, Deltalab S.L., Barcelona, Espanha), 0,5 mL de sangue foi colocado num tubo com EDTA (K3E 0,5 mL microtubo, Tapval Aquisel®, Barcelona, Espanha) para contagem total de eritrócitos e leucócitos, 0,5 mL de sangue foi colocado num tubo sem anticoagulante de modo a obter soro para a realização do proteinograma e, no caso da espécie abutre-preto, 1 mL de sangue foi colocado num tubo com heparina lítio (K3E 1 mL microtubo, Tapval Aquisel®, Barcelona, Espanha) para posteriores análises bioquímicas.

O esfregaço foi efetuado imediatamente após a colheita da amostra sanguínea, tendo sido colocado num local protegido para secar ao ar. O hematócrito foi também processado imediatamente, o sangue em EDTA foi refrigerado a 4 °C e processado em 24 h. O sangue em heparina lítio foi conservado a 4 °C e posteriormente enviado para um laboratório de referência, onde foram realizadas as análises bioquímicas. O envio foi feito num prazo máximo de 12 h. O sangue sem anticoagulante foi deixado à temperatura ambiente durante cerca de 2 h, para que se pudesse dar a formação e retração do coágulo. Uma vez formado o coágulo a amostra sanguínea foi centrifugada, separado o soro tendo este sido congelado a -20 °C.

2.3 Análises laboratoriais hematológicas

Todas as amostras de sangue colhidas foram analisadas, tendo sido realizadas as seguintes análises hematológicas: hematócrito, contagem total de eritrócitos (TRBC), contagem total de leucócitos pelo método direto (TWBC) e contagem diferencial de leucócitos. As técnicas utilizadas foram aquelas que estão descritas por Pendl e Samour (2009), e por Pendl (2011). O hematócrito foi obtido utilizando uma escala graduada, após os tubos capilares de microhematócrito terem sido centrifugados numa microcentrífuga (Modelo Biocen 20, Ortoalresa®, Ajalvir, Espanha) a 12,000G durante 5 minutos. Após a leitura do hematócrito, os tubos foram partidos e foi determinada a concentração de proteínas totais através de um refratômetro portátil (Schuco, 5711-2020, Clinical Refractometer, Tóquio, Japão).

A contagem total de eritrócitos e de leucócitos foi realizada num hemocítmetro - câmara de Neubauer *Improved* (Blaubrand®, Brand GmbH & Co. KG, refª 717820, Melsungen, Alemanha), após as amostras terem sido diluídas (1:200) numa pipeta hematológica de *Thoma* (Blaubrand®, Brand GmbH & Co. KG, Melsungen, Alemanha) com a solução de Natt and Herrick's.

A contagem diferencial de leucócitos foi efetuada utilizando o esfregaço sanguíneo, após este ter sido seco ao ar e corado com a coloração Wright Giemsa modificada. No mesmo esfregaço foi realizada a pesquisa de hemoparasitas.

Os valores de hematócrito, TRBC, TWBC e contagem diferencial de leucócitos obtidos para a amostra de abutres-pretos, encontram-se descritos na Tabela 9 – Anexo IV, de acordo com a sua média, desvio padrão, valor mínimo e máximo. Os valores obtidos para os mesmos parâmetros na amostra de grifos encontram-se descritos na Tabela 10 – Anexo V.

2.4 Análise laboratorial bioquímica

Como referido anteriormente, o sangue em heparina lítio foi enviado para um laboratório de referência onde foi realizada a análise bioquímica. Os parâmetros medidos foram o ácido úrico, ureia, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LDH), gama-glutamilttransferase (GGT), creatina cinase (CK), ácidos biliares, colesterol, amílase, glucose, potássio, sódio, cálcio, fósforo e proteínas totais.

Os resultados bioquímicos dos parâmetros atrás mencionados para a amostra de abutres-pretos, encontram-se apresentados na Tabela 11 – Anexo VI, de acordo com a sua média, desvio padrão, valor mínimo e máximo.

Não foram realizadas análises bioquímicas na amostra de grifos por motivos económicos.

2.5 Proteinograma

As amostras de sangue, previamente colocadas nos tubos sem anticoagulante, após a formação do coágulo foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos. O soro foi retirado com uma micropipeta (Eppendorf Reference®, 100 µL, Hamburgo, Alemanha) para um Eppendorf e devidamente identificado e congelado a -20 °C, até a realização da análise, por um período máximo de um mês.

Aquando da realização do proteinograma as amostras foram colocadas a 4 °C e quando no estado líquido foram homogeneizadas.

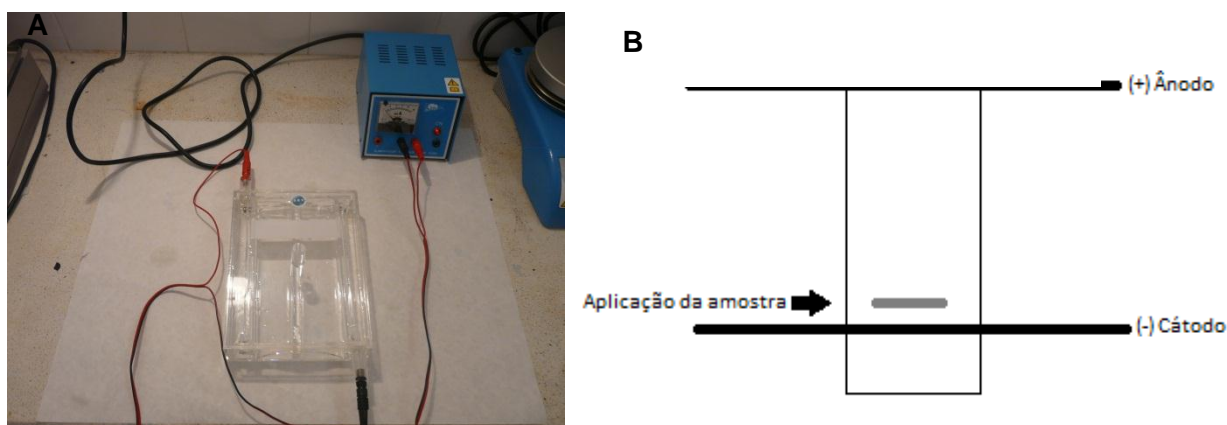
A técnica utilizada para a realização da eletroforese foi a eletroforese em acetato de celulose. Para a realização da mesma foi utilizada uma fonte elétrica (SBS®, Nº 7962/0000063, Mod: IELF – 203, Barcelona, Espanha), uma cuba de eletroforese (SBS®, Nº 8535/0000235, Mod: IELF – 202, Barcelona, Espanha) e tiras de acetato de celulose (Cellogel®, code 01A06 – 25, Milão, Itália). A Figura 11(A) ilustra o sistema eletroforético utilizado. Uma vez que não foi encontrado na literatura um protocolo de eletroforese em acetato de celulose específico para aves, foi adaptado um protocolo de medicina humana (Spinreact®, Sant Esteve de Bas, Espanha).

Protocolo de eletroforese em acetado de celulose utilizado:

- 1) Submergir as tiras de acetato de celulose numa solução tampão de TRIS com um pH de 8,8 (Cellogel®, code 02A13 – 10, Milão, Itália) durante 10 min.
- 2) Secar o excesso de solução tampão colocando as tiras entre dois papéis de filtro.
- 3) Colocar as tiras na ponte da cuba de eletroforese, de modo a ficarem tensas, como está representado na Figura 17.
- 4) Encher a cuba com solução tampão até atingir o nível marcado na cuba.
- 5) Aplicar a amostra de soro, com o auxílio de um aplicador, junto ao cátodo como se encontra representado na Figura 11(B).
- 6) Tapar a cuba e ligar a fonte elétrica. Realizar a eletroforese por um período de 70 min a uma voltagem constante de 200 volts.
- 7) Uma vez terminada a eletroforese, submergir as tiras em Negro de amido (Spinreact®, refª 1302020, Sant Esteve de Bas, Espanha) durante 10 min.
- 8) Após a coloração, efetuar lavagens sucessivas da tira com uma solução descolorante (Anexo VII) até que o fundo desta adquira uma coloração completamente branca.
- 9) Após a descoloração, colocar a tira numa solução diafanizadora (Cellogel®, code 06A06 – 51, Milão, Itália) durante 5 min.
- 10) Após a diafanização, colocar a tira numa estufa a 37 °C.

11) Após a secagem, proceder à leitura da tira num densitómetro (Crony instruments®, Digiscan, Rel. 1.2, Roma, Itália).

Figura 11. Sistema eletroforético (fotografia original) (A) e local de aplicação da amostra (original) (B)



2.6 Análise estatística

Para a realização da análise dos dados obtidos no presente estudo, recorreu-se à utilização do programa R 2.15.1 (R Development Core Team, 2011).

Todos os dados obtidos foram sujeitos a uma análise estatística descritiva e inferencial. A estatística descritiva foi utilizada para descrever dados quantitativos quanto aos seus indicadores estatísticos, mediana, percentil 25, percentil 75 valor mínimo e máximo. A estatística inferencial foi utilizada para tirar conclusões através da utilização de testes não paramétricos. Optou-se pela utilização de testes não-paramétricos devido ao número reduzido da amostra total e o número reduzido de animais que compunham cada um dos grupos considerados, e ainda pelos dados recolhidos não seguirem uma distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk). Apesar de se tratarem de indicadores estatísticos utilizados em análise paramétrica, a média e o desvio padrão foram calculados com o objetivo único de comparar os resultados obtidos neste estudo com outros estudos realizados em aves, que apenas fazem menção a estes valores.

Para qualquer variável, a comparação das diferenças entre grupos foi avaliada mediante o teste de Wilcoxon. Foi realizado um teste de Wilcoxon emparelhado para comparar os resultados obtidos na determinação das proteínas totais pelo método do biureto e por refratometria, com o objetivo de verificar se existiam diferenças significativas entre os dois métodos. Finalmente, recorreu-se à correlação de Spearman para determinar a existência de interligação entre os valores obtidos pelos dois métodos, para cada indivíduo.

Para todo o estudo estatístico considerou-se um intervalo de confiança de 95 % (valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta secção irão ser apresentados e discutidos simultaneamente os resultados obtidos no estudo de modo a facilitar a compreensão dos mesmos.

3.1 Proteinograma

Os resultados da determinação proteica e do fracionamento eletroforético da albumina, α 1-globulinas, α 2-globulinas, β -globulinas, γ -globulinas, globulinas e A/G para a amostra de abutres-pretos encontram-se descritos na Tabela 4, de acordo com a sua mediana, percentil 25, percentil 75, valor mínimo e máximo. Os resultados obtidos para os mesmos parâmetros na amostra de grifos encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 4. Valores de proteínas totais e frações proteicas obtidos nos abutres-pretos

| Parâmetros Bioquímicos | Unidade | n | \bar{x} | Percentis 25 - 75 | Mínimo - Máximo |
|----------------------------------|---------|----|-----------|----------------------|-----------------|
| Proteínas totais ^(#) | g/dL | 10 | 4,85 | 4,40 – 5,00 | 3,60 – 5,20 |
| Proteínas totais ^(##) | g/dL | 10 | 5,30 | 5,20 – 5,70 | 4,40 – 6,60 |
| Albumina | % | 10 | 53,65 | 49,37 – 63,50 | 44,50 – 74,90 |
| α 1-globulinas | % | 10 | 15,40 | 12,95 – 23,30 | 4,74 – 29,70 |
| α 2-globulinas | % | 10 | 8,50 | 7,32 – 14,52 | 2,86 – 23,10 |
| β -globulinas | % | 10 | 7,11 | 4,96 – 9,54 | 1,50 – 13,00 |
| γ -globulinas | % | 10 | 6,14 | 3,80 – 10,65 | 3,07 – 19,60 |
| Albumina/Globulinas | | 10 | 1,16 | 0,97 – 1,74 | 0,80 – 2,99 |
| # - Método do biureto | | | | | |
| ## - Refratometria | | | | | |

Tabela 5. Valores de proteínas totais e frações proteicas obtidos nos grifos

| Parâmetros Bioquímicos | Unidade | N | \bar{x} | Percentis 25 - 75 | Mínimo - Máximo |
|---|---------|----|-----------|-------------------|-----------------|
| Proteínas totais ^(##) | g/dL | 11 | 6,00 | 5,95 – 6,15 | 5,00 – 6,30 |
| Albumina | % | 11 | 59,50 | 57,20 – 61,75 | 53,00 – 70,40 |
| α1-globulinas | % | 11 | 8,47 | 6,96 – 15,75 | 2,91 – 20,60 |
| α2-globulinas | % | 11 | 8,76 | 6,94 – 13,40 | 3,14 – 20,70 |
| β-globulinas | % | 11 | 10,10 | 7,21 – 12,00 | 2,50 – 21,80 |
| γ-globulinas | % | 11 | 8,45 | 6,74 – 9,28 | 1,32 – 16,80 |
| Albumina/Globulinas | | 11 | 1,47 | 1,34 – 1,61 | 1,13 – 2,38 |
| ## - Refratometria | | | | | |

3.1.1 Proteínas totais

3.1.1.1 Abutre-preto

A média dos valores de PT obtidos pelo método do biureto para amostra de abutres-pretos foi de $4,6 \pm 0,53$ g/dL, encontrando-se ligeiramente acima do intervalo de valores descrito por Campbell (2006) para a classe das aves em geral (2,5-4,5 g/dL).

A análise da concentração sérica das PT em função do sexo (Gráfico 4 A)) demonstra que as fêmeas tendencialmente apresentam valores de PT mais elevados. No entanto, o teste de Wilcoxon mostrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre machos e fêmeas ($W=14,5$ e $p=0,43$; para $p<0,05$). Os valores superiores de PT encontrados neste estudo estão de acordo com o que se encontra descrito por Lumeij (1987), e por van Wyk *et al.* (1998). As fêmeas tendem a apresentar valores mais elevados de PT que os machos. Esta diferença acentua-se antes da postura do ovo devido ao aumento das frações α e β das globulinas, que englobam algumas proteínas (nomeadamente a vitelogenina e outras lipoproteínas) que são importantes para a formação do vitelo. Antes da postura ocorre também um aumento de proteínas com função de transporte, como albumina, de modo a que o cálcio que é reabsorvido nos ossos seja utilizado na mineralização da casca (Lumeij, 1987; van Wyk *et al.*, 1998). É importante salientar que nenhuma das aves incluídas neste estudo se encontrava dentro da época reprodutiva.

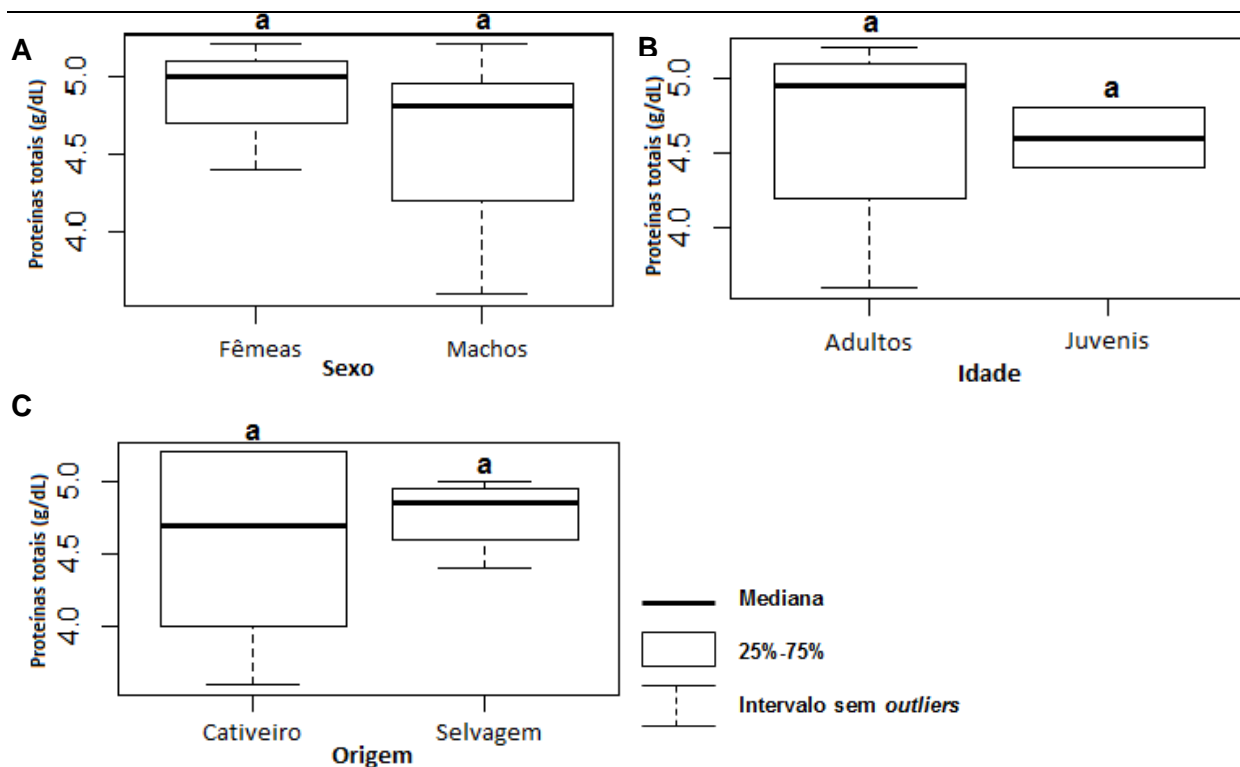
A concentração sérica das PT em função idade encontra-se representada no Gráfico 4 B). Observa-se que os indivíduos adultos apresentam valores mais elevados de PT que os juvenis. Com o objetivo de verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de indivíduos com diferente idade, foi realizado um teste de Wilcoxon, concluindo-se que na amostra considerada não existiam diferenças significativas entre os

grupos relativamente aos valores de PT ($W=10,5$ e $p=0,59$; para $p<0,05$). O aumento do nível de PT em função da idade está relacionado com o aumento da concentração de imunoglobulinas (à medida que o sistema imunitário se desenvolve) (Cray *et al.*, 2007) e com o aumento da exigência tecidual em proteínas e aminoácidos, durante o crescimento (Villegas *et al.*, 2002).

Quanto à origem dos animais, os animais selvagens apresentaram valores superiores de PT relativamente aos animais provenientes de cativeiro. No entanto, o teste de Wilcoxon demonstrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos ($W=12$ e $p=1$; para $p<0,05$). O nível de PT mais elevado encontrado em animais selvagens poderá dever-se a uma maior estimulação antigénica encontrada pelos animais no estado selvagem, que conduz a concentrações mais elevadas de globulinas e, por consequência, de PT. Villegas *et al.* (2002) encontraram a mesma diferença entre animais selvagens e provenientes de cativeiro. Dobado-Berrios, Tella, Ceballos e Donázar (1998) relataram concentrações proteicas mais elevadas em indivíduos cativos comparativamente aos indivíduos selvagens, sugerindo como explicação para esta diferença a dieta controlada e altamente proteica à qual os animais em cativeiro estavam sujeitos. Os animais que foram incorporados neste estudo foram também sujeitos a uma dieta rica em proteínas composta por pintos, coração e coelho congelados, no entanto foram os animais selvagens que apresentaram níveis superiores de PT. No Gráfico 4 C) encontra-se representada a concentração sérica das PT em função da origem.

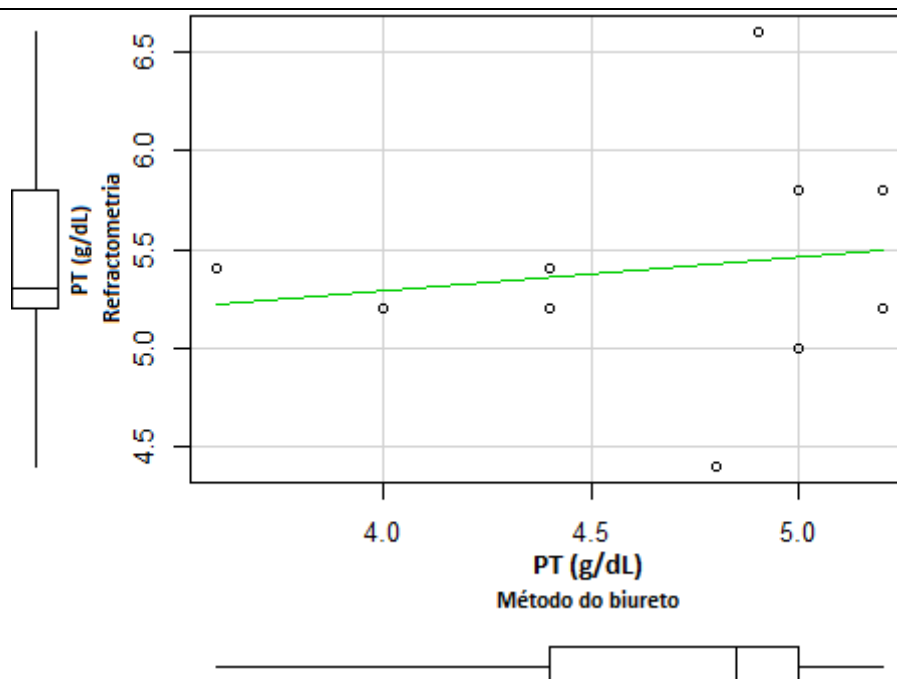
Os valores obtidos neste estudo são significativamente superiores aos valores descritos por Villegas *et al.* (2002) em crias e adultos de abutre-preto, em estado selvagem e em cativeiro. Comparativamente aos valores descritos para outros membros da ordem dos Accipitriformes, os resultados obtidos neste estudo foram superiores àqueles que estão relatados para águias-de-cabeça-branca (*Haliaeetus leucocephalus*), águias-marinhas-de-Steller (*Haliaeetus pelagicus*), águias de Harris (*Parabuteo unicinctus*), urubus-de-cabeça-preta (*Coragyps atratus*) (Tatum *et al.*, 2000), quebra-ossos (*Gypaetus barbatus*) (Hernández & Margalida, 2010), abutres do Egipto (*Neophron percnopterus*) (Dobado-Berrios *et al.*, 1998), águias imperiais (*Aquila adalberti*) (Ferrer & Dobado-Berrios, 1998), abutres africanos (*Pseudogyps africanus*) (van Wyk *et al.*), e semelhantes aos valores descritos para búteos-de-cauda-vermelha (*Buteo jamaicensis*), urubus-de-cabeça-vermelha (*Cathartes aura*) (Tatum *et al.*, 2000), águias reais (*Aquila chrysaetos*) (Nazifi *et al.*, 2008) e águias-de-asa-redonda (*Buteo buteo*) (Spagnolo *et al.*, 2006).

Gráfico 4. Concentração sérica (g/dL) da proteína total nos abutres-pretos em função do A) sexo, B) idade e C) origem. Nas fêmeas o n=3, nos machos o n=7, nos adultos o n=8, nos juvenis o n=2, nos cativos o n=6 e nos selvagens o n=4. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



A média dos valores de PT obtidos por refratometria para a amostra de abutres-pretos foi de $5,4 \pm 0,58$ g/dL. Com o objetivo de verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre o método do biureto e a refratometria, foi realizado um teste de Wilcoxon Emparelhado, concluindo-se que existiam diferenças significativas entre os dois métodos ($V=1$ e $p=0,02$; para $p<0,05$). Comparando os valores obtidos pelos dois métodos, conclui-se que os valores obtidos por refratometria são superiores aos valores obtidos pelo método do biureto, o que vai de encontro ao que está descrito por Cray *et al.* (2008) e por Lumeij e de Bruijne (1985), reforçando a ideia que a refratometria deve ser encarada como um método rápido, e pouco exato, para determinar o nível de PT. A razão desta inconsistência está relacionada com o facto de que, um aumento na fração sólida não proteica aumenta também facciosamente a medição refratométrica da fração proteica. Os compostos normalmente responsáveis por estes valores erróneos são o colesterol, a ureia, as lipoproteínas e a glucose (George, 2001). Idealmente a determinação das proteínas totais deve ser realizada pelo método do biureto ou por eletroforese (Campbell, 2006).

Gráfico 5. Distribuição gráfica dos valores de PT determinados por refratometria e método do biureto



A análise do Gráfico 5 permite verificar que a distribuição dos valores é assimétrica, não existindo uma relação linear entre os dois parâmetros. A realização de um teste de correlação de Spearman permitiu verificar que os dois parâmetros não se correlacionavam significativamente ($S=141,87$ e $p=0,69$; para $p<0,05$). A ausência de correlação entre os dois parâmetros está relacionada com a presença de vários compostos que influenciam o valor determinado por refratometria, nomeadamente aqueles encontrados em maior quantidade no plasma das aves como é o caso do colesterol, ureia, lipoproteínas e glucose (George, 2001).

3.1.1.2 Grifo

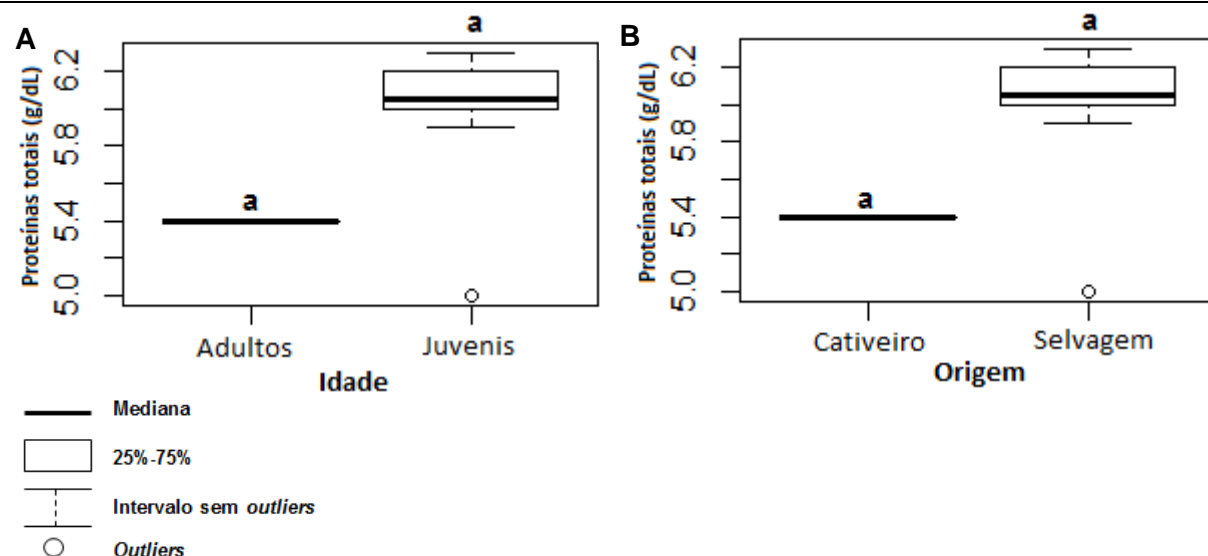
A média dos valores de PT obtidos por refratometria para a amostra de grifos $5,9 \pm 0,39$ g/dL, encontrando-se bastante acima do intervalo de valores descrito por Campbell (2006) para a classe das aves em geral (2,5-4,5 g/dL).

A concentração sérica das PT em função da idade (Gráfico 6 A)) sugere que os animais juvenis apresentam valores mais elevados de PT que os animais adultos. Esta observação está em desacordo com o que se encontra descrito na bibliografia (Cray *et al.*, 2007; Lanzarot *et al.*, 2005), e estará relacionada com o reduzido número de indivíduos que compõe a amostra de animais adultos ($n=1$). O teste de Wilcoxon demonstrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre aves adultas e juvenis ($W=1$ e $p=0,26$; para $p<0,05$).

A concentração sérica das PT segundo a origem encontra-se representada no Gráfico 6 B), permitindo a sua observação verificar que os valores são mais elevados em indivíduos selvagens. No entanto, devido ao reduzido número de animais que compõe a amostra de aves cativas (n=1) não é possível estabelecer nenhuma relação. O teste de Wilcoxon demonstrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos selvagens e o indivíduo proveniente de cativoiro ($W=1$ e $p=0,26$; para $p<0,05$).

Os resultados obtidos neste estudo são superiores aos valores obtidos por Polo *et al.* (1992) e por Balasch, Musquera, Palacios, Jimenez e Palomeque (1976) em grifos, embora estes autores tenham utilizado a técnica de Lowry e o método do biureto, respetivamente. A diferença encontrada entre os valores obtidos neste estudo e os valores obtidos noutros estudos realizados em grifos (Balasch *et al.*, 1976; Polo *et al.*, 1992), e o intervalo de valores descrito por Campbell (2006) para a classe das aves em geral poderá estar relacionada com a composição da amostra, uma vez que esta é composta quase única e exclusivamente por animais provenientes do estado selvagem (cerca de 91 %). Possivelmente estes animais são sujeitos a uma estimulação antigénica maior na Natureza, que conduz a concentrações mais elevadas de globulinas e, por consequência, de PT. Outra explicação para a diferença encontrada entre este estudo e os estudos realizados por Polo *et al.* (1992) e por Balasch *et al.* (1976) poderá estar relacionada com o método utilizado para determinar a concentração sérica de PT neste estudo, a refratometria, que como já foi referido anteriormente conduz à sobrestimação dos valores de PT.

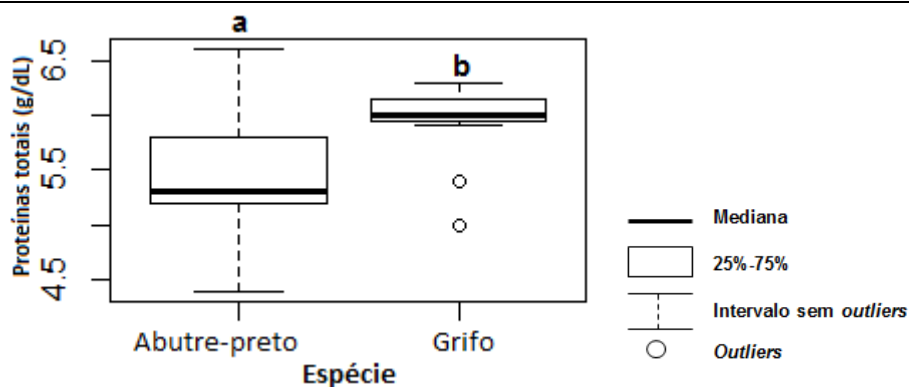
Gráfico 6. Concentração sérica (g/dL) da proteína total nos grifos em função da A) idade e B) origem. Nos adultos o n=1, nos juvenis o n=10, nos cativos o n=1 e nos selvagens o n=10. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.1.3 Abutre-preto e grifo

A análise da concentração sérica das PT em função da espécie (Gráfico 7) indica, para a amostra em estudo, que as aves pertencentes à espécie grifo apresentam valores superiores de PT. A realização de um teste de Wilcoxon demonstrou existirem diferenças estatisticamente significativas entre as duas espécies ($W=21,5$ e $p=0,02$; para $p<0,05$). A diferença encontrada entre as duas espécies poderá estar relacionada com o facto da amostra de grifos ser constituída quase única e exclusivamente por animais provenientes do estado selvagem (cerca de 91 %). Ao passo que a amostra de abutre-pretos é constituída na sua maioria por animais provenientes de cativeiro (60 %). E como já foi referido anteriormente, é possível que os animais selvagens sejam sujeitos a uma estimulação antigénica maior na Natureza, que conduz a concentrações mais elevadas de globulinas e, por consequência, de PT.

Gráfico 7. Concentração sérica (g/dL) da proteína total em função da espécie. Nos abutres-pretos o $n=10$ e nos grifos o $n=11$. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.2 Albumina

3.1.2.1 Abutre-preto

A média dos valores de albumina obtidos para amostra de abutres-pretos foi de $57,1 \pm 10,69$ %.

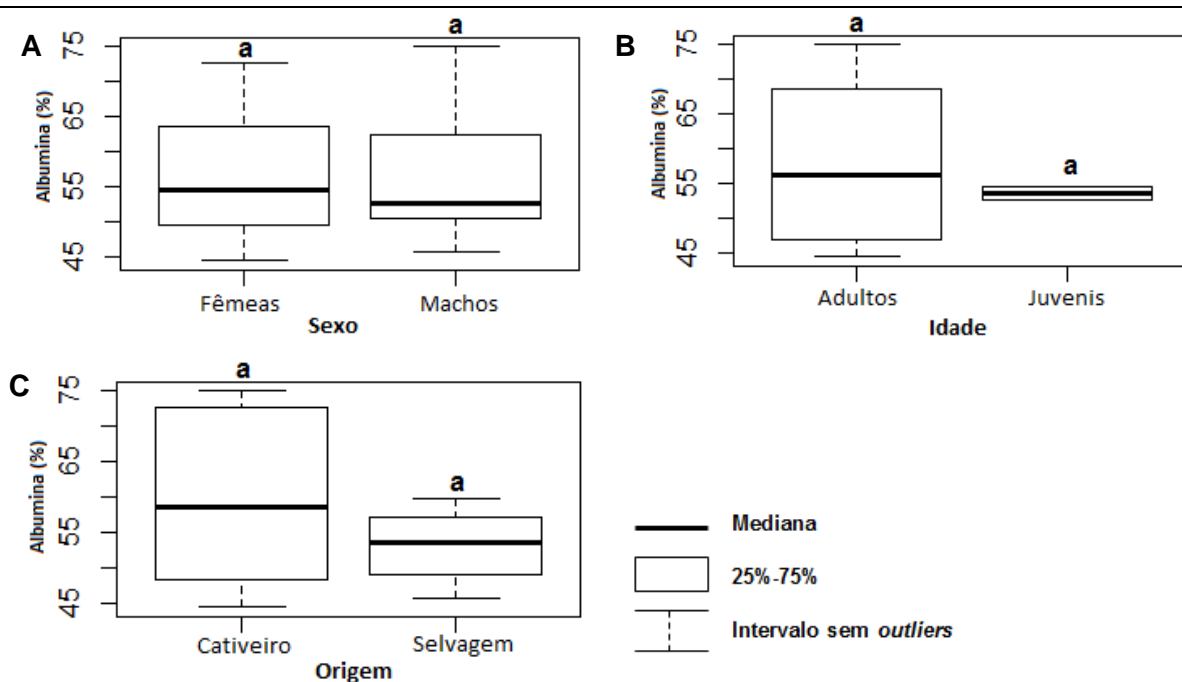
A percentagem de albumina no soro em função do sexo dos indivíduos encontra-se representada no Gráfico 8 A), permitindo concluir que estes valores são ligeiramente superiores em fêmeas. O teste de Wilcoxon realizado para a comparação de medianas entre os grupos considerados para a variável sexo mostrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre estes ($W=10$ e $p=1$; para $p<0,05$). A bibliografia consultada é omissa em relação a esta variação, estando apenas descrito o aumento da albumina, tal como de outras proteínas com função de transporte, durante a época reprodutiva antes da postura do ovo, durante a fase de mineralização da casca (Spagnolo *et al.*, 2006). Como já foi referido anteriormente, as aves incluídas neste estudo estavam fora da época reprodutiva, não sendo possível uma comparação direta.

A percentagem de albumina no soro segundo a idade (Gráfico 8 B)) sugere que os animais adultos apresentam valores ligeiramente mais elevados de albumina que os animais juvenis. Com o objetivo de verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de indivíduos com diferente idade, foi realizado um teste de Wilcoxon, concluindo-se que na amostra considerada não existiam diferenças significativas entre os grupos relativamente aos valores de albumina ($W=9$ e $p=0,89$; para $p<0,05$). A relação encontrada neste estudo entre a albumina e idade está de acordo com a bibliografia consultada. Os indivíduos mais jovens apresentam valores de albumina mais baixos que os adultos, ocorrendo um aumento gradual à medida que a ave se desenvolve (Cray *et al.*, 2007; Lanzarot *et al.*, 2005). A análise do Gráfico 8 B) permite ainda verificar que existe um número considerável de animais adultos com valores percentuais de albumina inferiores aos dos animais juvenis. Esta observação pode dever-se à idade mais avançada destes indivíduos, uma vez que está descrito um decréscimo da concentração de albumina em animais mais velhos (van Wyk *et al.*, 1998).

Quanto à origem dos animais, os animais selvagens apresentaram valores percentuais de albumina inferiores comparativamente aos animais provenientes de cativeiro. No entanto, o teste de Wilcoxon demonstrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos ($W=15$ e $p=0,61$; para $p<0,05$). O valor relativo de albumina mais elevado em indivíduos cativos está possivelmente relacionado com a dieta controlada e rica em proteínas (pintos, coelho e coração congelados) a que estes animais estavam sujeitos (Dobado-Berrios *et al.*, 1998). No Gráfico 8 C) encontra-se representada a percentagem de albumina no soro em função da origem dos indivíduos.

Não estão disponíveis na literatura valores de albumina em abutres pretos. Comparativamente a outros membros da ordem dos Accipitriformes, este estudo apresenta resultados ligeiramente superiores a Ordonneau, Roman e Chaste-Duvernoy (2005) e Tatum *et al.* (2000). A técnica de eletroforese utilizada nestes dois trabalhos foi a AGE.

Gráfico 8. Percentagem de albumina no soro nos abutres-pretos em função do A) sexo, B) idade e C) origem. Nas fêmeas o n=3, nos machos o n=7, nos adultos o n=8, nos juvenis o n=2, nos cativos o n=6 e nos selvagens o n=4. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.2.2 Grifo

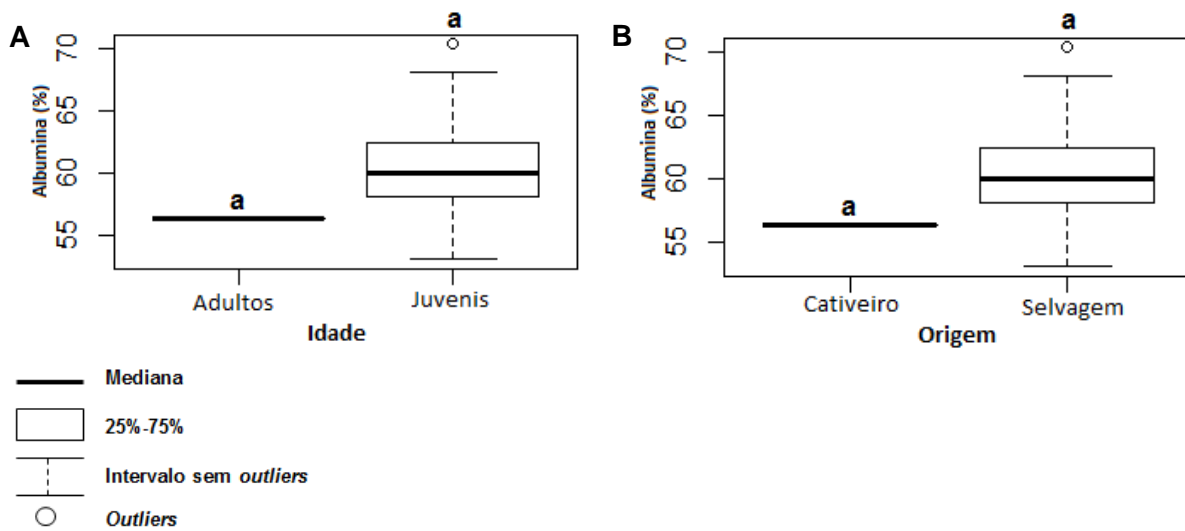
A média dos valores de albumina obtidos para amostra de grifos foi de $60,4 \pm 5,18$ %.

A análise da percentagem de albumina no soro em função da idade (Gráfico 9 A)) e origem (Gráfico 9 B)) sugere que os animais juvenis e em estado selvagem apresentam um valor mais elevado de albumina que os animais mais velhos e provenientes de cativeiro. Ambas as observações estão em desacordo com o que se encontra descrito na literatura para estas duas variáveis (Dobado-Berrios *et al.*, 1998; Lanzarot *et al.*, 2005), e devem-se possivelmente ao número reduzido de indivíduos que compunha a amostra de animais adultos e em cativeiro ($n=1$).

A realização do teste de Wilcoxon permitiu concluir que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre adultos e juvenis ($W=2$ e $p=0,54$; para $p<0,05$), e entre aves selvagens e aves provenientes de cativeiro ($W=2$ e $p=0,54$; para $p<0,05$).

Os valores obtidos neste trabalho são superiores aos valores obtidos em grifos por Polo *et al.* (1992) e por Balasch *et al.* (1976), que utilizaram plasma. Estes autores obtiveram uma sexta fração eletroforética, a pré-albumina, que não foi fracionada neste estudo. Este facto pode dever-se a um tempo insuficiente de eletroforese, não tendo ocorrido a separação da pré-albumina da albumina. Isto explicaria os valores mais elevados de albumina encontrados neste trabalho. No entanto, está também descrito que em aves de rapina a fração de pré-albumina muitas vezes é negligenciável (Cray & Tatum, 1998).

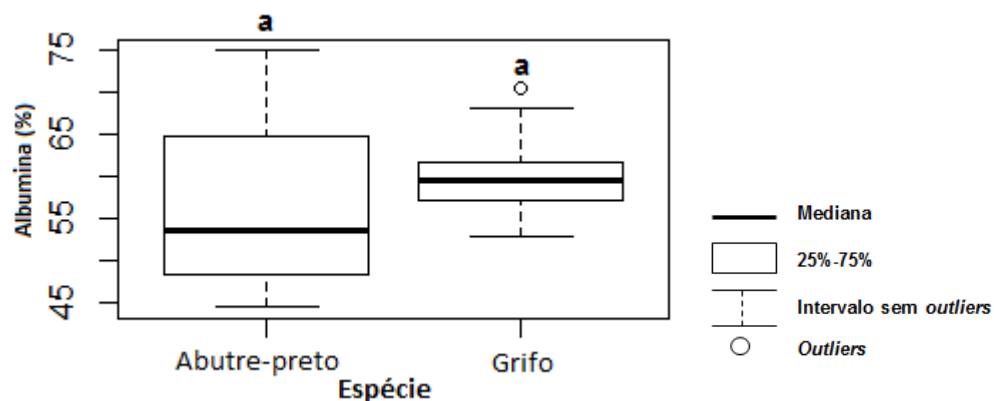
Gráfico 9. Percentagem de albumina no soro nos grifos em função da A) idade e B) origem. Nos adultos o n=1, nos juvenis o n=10, nos cativos o n=1 e nos selvagens o n=10. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.2.3 Abutre-preto e grifo

A análise da percentagem de albumina no soro em função da espécie (Gráfico 10) permite concluir, para a amostra em estudo, que as aves pertencentes à espécie grifo apresentam valores superiores de albumina. A realização de um teste de Wilcoxon demonstrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre as duas espécies ($W=38$ e $p=0,25$; para $p<0,05$).

Gráfico 10. Percentagem de albumina no soro em função da espécie. Nos abutres-pretos o n=10 e nos grifos o n=11. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.3 α 1-globulinas

3.1.3.1 Abutre-preto

A média dos valores das α 1-globulinas obtidos para amostra de abutres-pretos foi de $16,9 \pm 8,91$ %.

A análise da percentagem das α 1-globulinas no soro segundo o sexo dos indivíduos (Gráfico 11 A)) demonstra que os machos apresentam valores ligeiramente mais elevados desta fração de globulinas. No entanto, o teste de Wilcoxon mostrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre machos e fêmeas ($W=11$ e $p=1$; para $p<0,05$). Com exceção do já referido aumento da fração α no período de pré-postura, não está descrita na literatura a influência do sexo no valor das α 1-globulinas.

A percentagem das α 1-globulinas no soro em função da idade encontra-se representada no Gráfico 11 B). Observa-se que os indivíduos adultos apresentam valores mais elevados da fração α 1 das globulinas que os juvenis. O teste de Wilcoxon realizado para a comparação de medianas entre os grupos considerados para a variável idade mostrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre estes ($W=14$ e $p=0,18$; para $p<0,05$). Na bibliografia consultada não foram encontradas referências ao papel da idade no valor da fração α das globulinas.

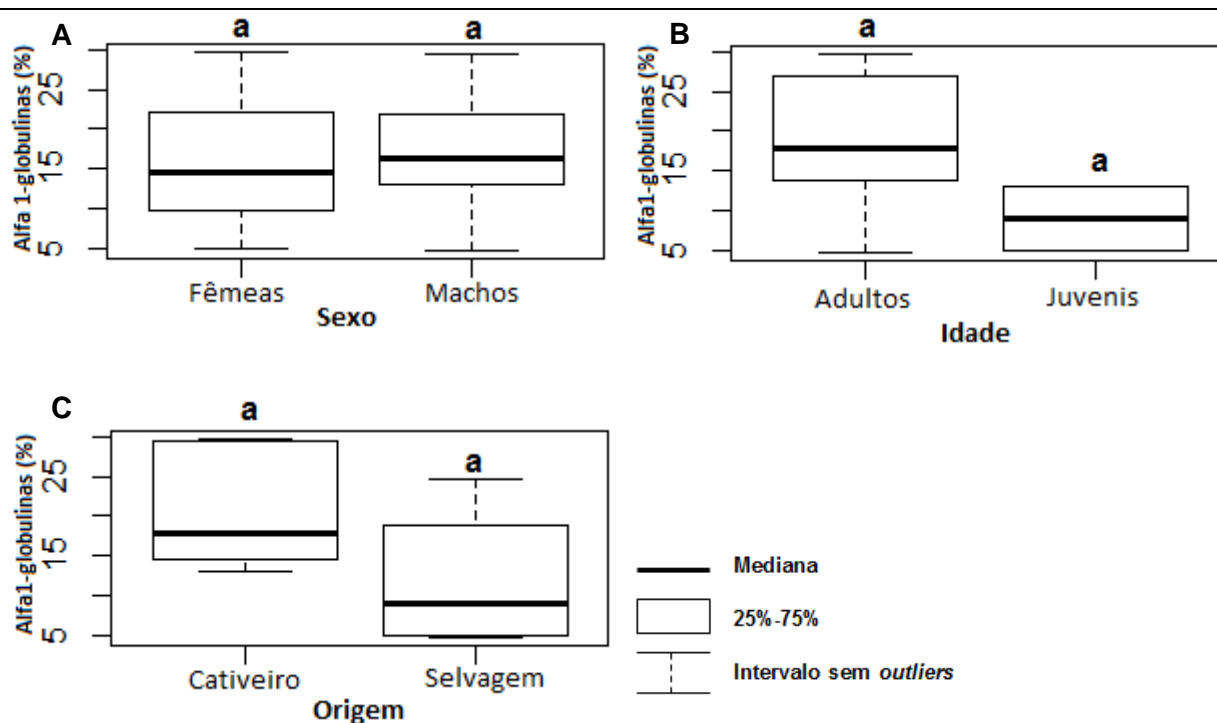
A análise da percentagem da fração α 1 das globulinas no soro segundo a origem dos indivíduos (Gráfico 11 C)) demonstra que os abutres-pretos provenientes de cativeiro apresentam valores mais elevados desta fração de globulinas. Foi realizado um teste de Wilcoxon de modo a determinar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para a variável origem, concluindo-se não existirem diferenças significativas entre os grupos considerados ($W=20$ e $p=0,11$; para $p<0,05$). Os valores relativos mais elevados observados nos animais provenientes de cativeiro poderão estar relacionados com a alimentação rica em proteína a que os animais cativos estavam sujeitos. Num estudo realizado por Polat *et al.* (2004) foi relatado um aumento da fração α em avestruzes (*Struthio camelus*) alimentadas com uma dieta de elevado teor proteico. Este facto pode ainda explicar os valores percentuais de α 1-globulinas mais baixos encontrados nos animais juvenis, uma vez que este grupo era composto única e exclusivamente por animais selvagens.

O valor médio das α 1-globulinas observado neste estudo ($16,9 \pm 8,91$ %) vem reforçar a ideia que as aves de rapina, em comparação com as restantes aves, apresentam valores mais elevados da fração α 1 das globulinas. De acordo com Cray e Tatum (1998) a fração α 1 pode chegar a atingir 27 % da concentração proteica total. Neste estudo o valor máximo observado foi ligeiramente superior (29,7 %).

Na bibliografia consultada, não foram encontrados estudos onde se tenha efetuado o fracionamento da fração α 1 das globulinas em abutres-pretos. No entanto, os valores obtidos neste trabalho são semelhantes aos valores obtidos por Gelli *et al.* (2009) e

Spagnolo *et al.* (2006) em águias-de-asa redonda. Gelli *et al.* (2009) utilizaram a eletroforese capilar como técnica de eletroforese, e como material de amostra soro. Spagnolo *et al.* (2006) utilizaram plasma. Num estudo realizado com espécies pertencentes à ordem dos Accipitriformes, foram observados valores de $\alpha 1$ -globulinas semelhantes aos obtidos neste estudo, com exceção do búteo-de-cauda-vermelha, do urubu-de-cabeça-vermelha e do urubu-de-cabeça-preta, que apresentaram valores inferiores (Tatum *et al.*, 2000).

Gráfico 11. Percentagem das $\alpha 1$ -globulinas no soro nos abutres-pretos em função do A) sexo, B) idade e C) origem. Nas fêmeas o n=3, nos machos o n=7, nos adultos o n=8, nos juvenis o n=2, nos cativos o n=6 e nos selvagens o n=4. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).

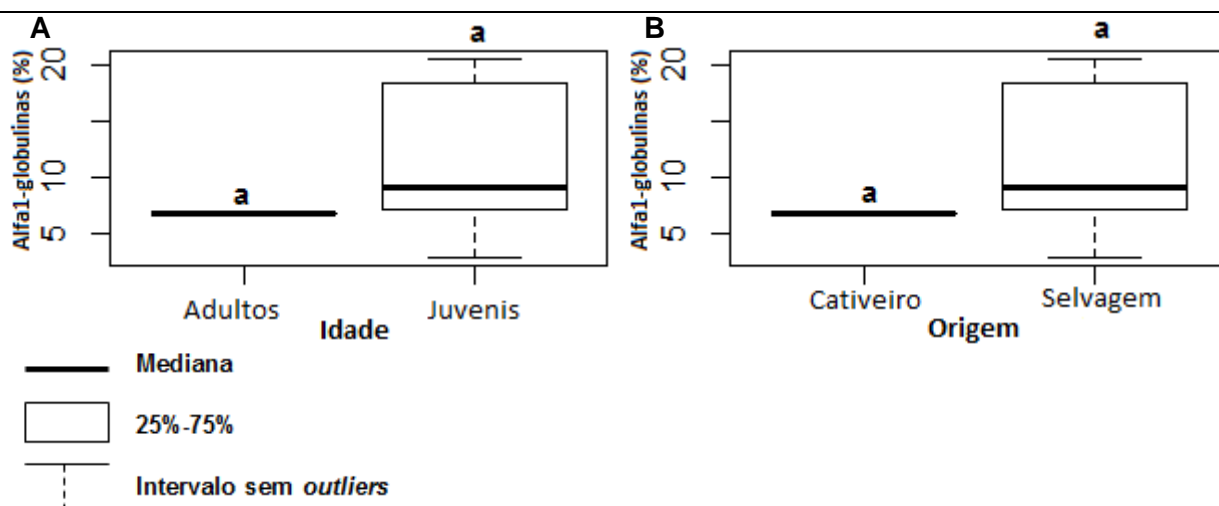


3.1.3.2 Grifo

A média dos valores das $\alpha 1$ -globulinas obtidos para amostra de grifos foi de $10,8 \pm 6,22$ %. A análise da percentagem das $\alpha 1$ -globulinas no soro segundo a idade (Gráfico 12 A)) e origem (Gráfico 12 B)) sugere que os animais juvenis e em estado selvagem apresentam um valor percentual de $\alpha 1$ -globulinas mais elevado que os animais mais velhos e provenientes de cativoiro. Estas duas observações são contrárias às relações encontradas nos abutres-pretos, devendo-se provavelmente, uma vez mais, ao número reduzido de animais que compunham o grupo de aves adultas e provenientes de cativoiro (n=1). A realização do teste de Wilcoxon permitiu concluir que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre adultos e juvenis ($W=2$ e $p=0,54$; para $p<0,05$), e entre aves selvagens e aves provenientes de cativoiro ($W=2$ e $p=0,54$; para $p<0,05$).

Os valores obtidos neste estudo são inferiores aos valores obtidos em grifos por Polo *et al.* (1992), provavelmente porque estes autores não fracionaram as duas frações α . Comparativamente aos resultados obtidos por Balasch *et al.* (1976), também em grifos, os valores obtidos neste trabalho são semelhantes.

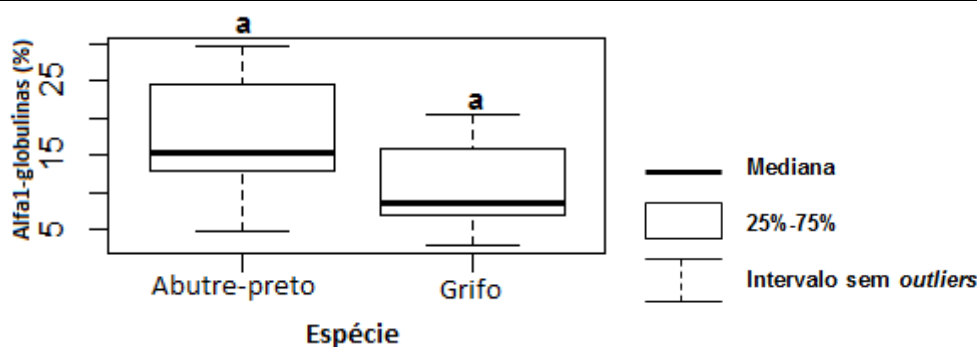
Gráfico 12. Percentagem das α 1-globulinas no soro nos grifos em função da A) idade e B) origem. Nos adultos o n=1, nos juvenis o n=10, nos cativos o n=1 e nos selvagens o n=10. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.3.3 Abutre-preto e Grifo

A análise da percentagem das α 1-globulinas no soro em função da espécie (Gráfico 13) permite concluir, para a amostra em estudo, que as aves pertencentes à espécie abutre-preto apresentam valores percentuais de α 1-globulinas superiores. A realização de um teste de Wilcoxon demonstrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre as duas espécies ($W=77,5$ e $p=0,12$; para $p<0,05$).

Gráfico 13. Percentagem das α 1-globulinas no soro em função da espécie. Nos abutres-pretos o n=10 e nos grifos o n=11. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.4 α 2-globulinas

3.1.4.1 Abutre-preto

A média dos valores das α 2-globulinas obtidos para amostra de abutres-pretos foi de $10,9 \pm 6,28 \%$.

A percentagem das α 2-globulinas no soro em função do sexo encontra-se representada no Gráfico 14 A). Esta permite observar que as fêmeas apresentam valores relativos de α 2-globulinas ligeiramente mais elevados. Esta diferença pode dever-se à influência que o estrogénio tem na concentração de α -globulinas em circulação. Embora estando fora da época reprodutiva, as fêmeas que foram incluídas neste estudo possivelmente estavam ativas do ponto de vista reprodutivo, sendo o estrogénio o responsável pela diferença, mesmo que ténue, no nível de α 2-globulinas entre os dois sexos (Fudge & Speer, 2001). Com objetivo de verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre machos e fêmeas, foi realizado um teste de Wilcoxon, concluindo-se que na amostra considerada não existiam diferenças significativas entre os dois grupos relativamente aos valores das α 2-globulinas ($W=9$ e $p=0,83$; para $p<0,05$).

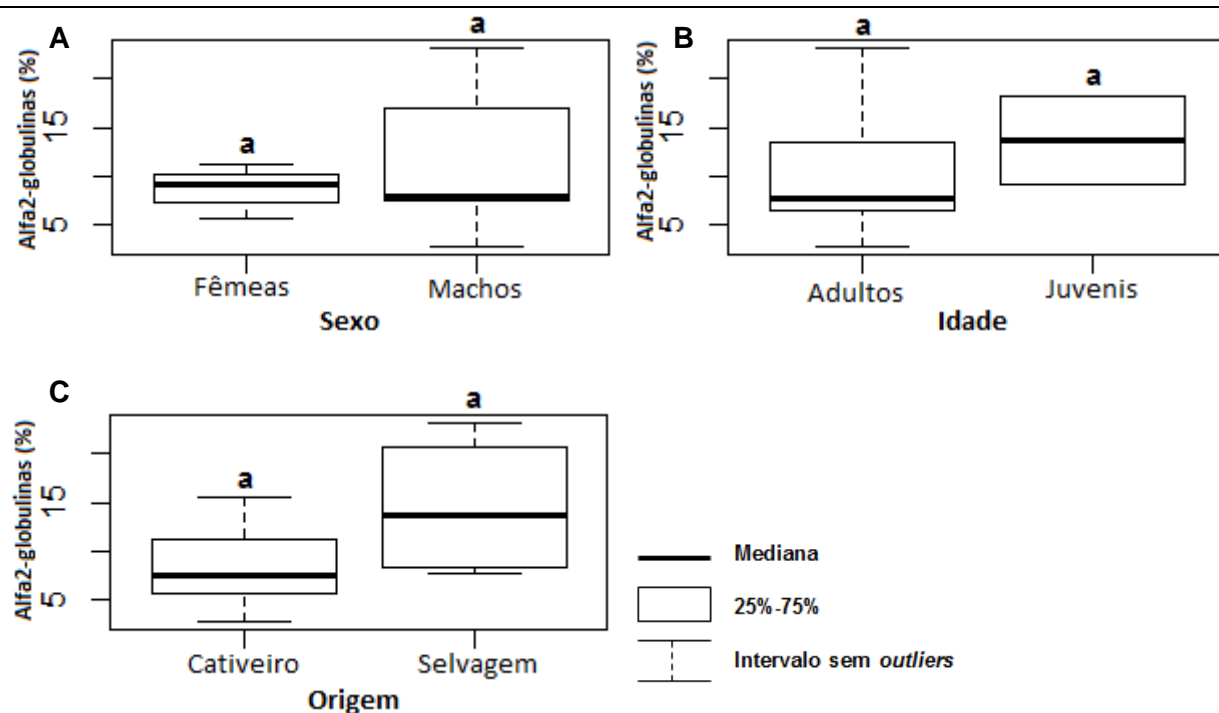
No Gráfico 14 B) encontra-se representada a percentagem da fração α 2 das globulinas no soro em função da idade. Da sua análise conclui-se que os indivíduos juvenis apresentam valores percentuais de α 2-globulinas superiores. No entanto, o teste de Wilcoxon mostrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre animais adultos e animais juvenis ($W=4$ e $p=0,4$; para $p<0,05$).

Relativamente à origem dos animais, os animais selvagens apresentaram valores relativos de α 2-globulinas superiores. No entanto, o teste de Wilcoxon demonstrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos ($W=5$ e $p=0,17$; para $p<0,05$). O valor mais elevado da fração α 2 encontrado em animais selvagens pode estar relacionado com a altura do ano em que se realizou a colheita da amostra, início do Outono, quando as temperaturas começavam a baixar, uma vez que o aumento da fração α 2 das globulinas, como parte da APR, está descrito em casos de animais hipotérmicos (Hochleithner, 1994). Este facto pode ainda explicar os valores percentuais de α 2-globulinas superiores encontrados nos animais juvenis, uma vez que este grupo era composto única e exclusivamente por animais selvagens.

No Gráfico 14 C) está representada a percentagem das α 2-globulinas no soro em função da origem.

A média dos valores das α 2-globulinas obtidas neste estudo, para amostra de abutres-pretos, ($10,9 \pm 6,28 \%$) vai de encontro ao está descrito por Tatum *et al.* (2000) relativamente ao valor das α 2-globulinas em aves de rapina, e é inferior ao limite máximo descrito por Cray e Tatum (1998) (16 %) para as mesmas aves. Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos valores que estão descritos para outros membros da ordem dos Accipitriformes (Gelli *et al.*, 2009; Tatum *et al.*, 2000).

Gráfico 14. Percentagem das $\alpha 2$ -globulinas no soro nos abutres-pretos em função do A) sexo, B) idade e C) origem. Nas fêmeas o n=3, nos machos o n=7, nos adultos o n=8, nos juvenis o n=2, nos cativos o n=6 e nos selvagens o n=4. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).

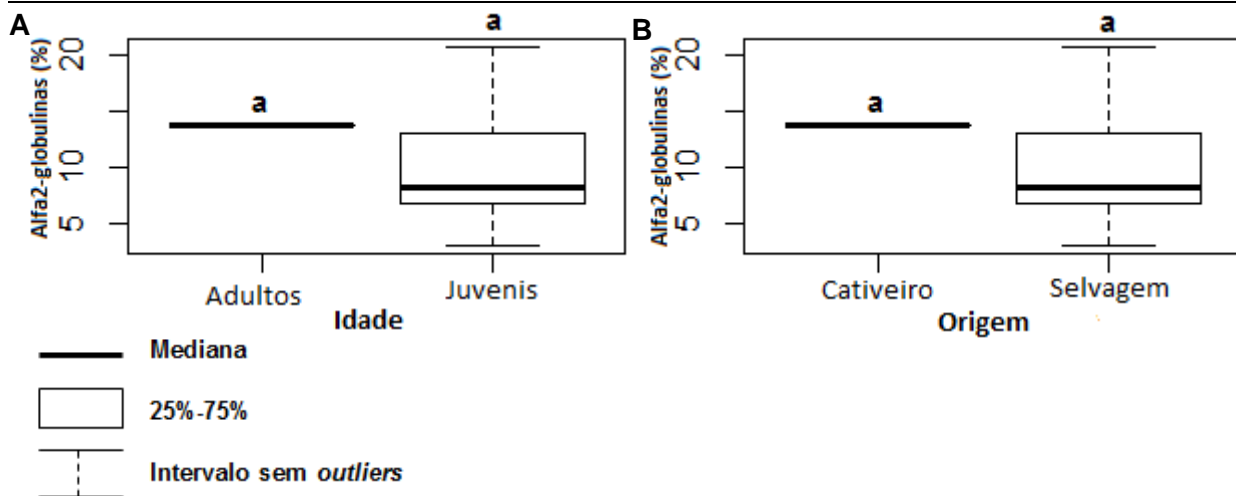


3.1.4.2 Grifo

A média dos valores das $\alpha 2$ -globulinas obtidos para amostra de grifos foi de $10,0 \pm 5,33$ %. Nos Gráficos 15 A) e 15 B) encontram-se representadas a percentagem das $\alpha 2$ -globulinas no soro em função da idade e origem, respetivamente. Observa-se que os animais adultos e provenientes de cativeiro apresentam valores relativos de $\alpha 2$ -globulinas superiores. Estas duas relações representam o oposto do que foi observado na amostra de abutres-pretos, e provavelmente estarão relacionadas com o facto das amostras de animais adultos e em cativeiro serem constituídas pelo mesmo individuo. A realização do teste de Wilcoxon permitiu concluir que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre adultos e juvenis ($W=8$ e $p=0,54$; para $p<0,05$), e entre aves selvagens e aves provenientes de cativeiro ($W=8$ e $p=0,54$; para $p<0,05$).

Os valores obtidos neste estudo são inferiores aos valores obtidos por Polo *et al.* (1992), provavelmente porque estes autores não fracionaram as duas frações α , e são semelhantes aos resultados obtidos por Balasch *et al.* (1976).

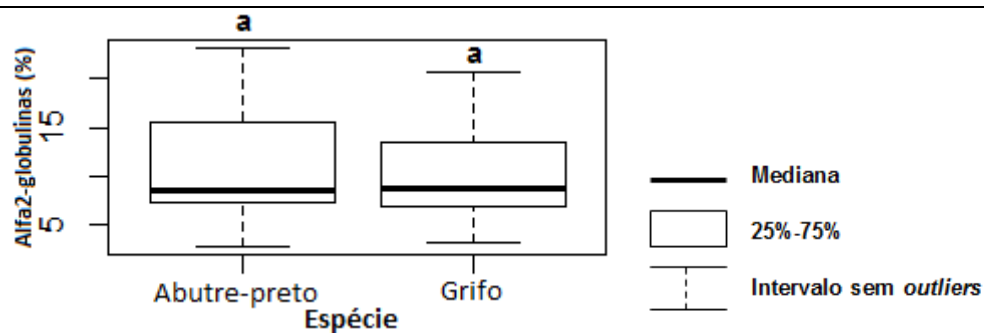
Gráfico 15. Percentagem das $\alpha 2$ -globulinas no soro nos grifos em função da A) idade e B) origem. Nos adultos o n=1, nos juvenis o n=10, nos cativos o n=1 e nos selvagens o n=10. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.4.3 Abutre-preto e grifo

A percentagem das $\alpha 2$ -globulinas no soro segundo a espécie encontra-se representada no Gráfico 16. Esta permite observar que as duas espécies apresentam valores percentuais $\alpha 2$ -globulinas semelhantes. A realização de um teste de Wilcoxon demonstrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre as duas espécies ($W=59$ e $p=0,81$; para $p<0,05$).

Gráfico 16. Percentagem das $\alpha 2$ -globulinas no soro em função da espécie. Nos abutres-pretos o n=10 e nos grifos o n=11. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.5 β -globulinas

3.1.5.1 Abutre-preto

A média dos valores das β -globulinas obtidos para amostra de abutres-pretos foi de $7,2 \pm 3,77 \%$.

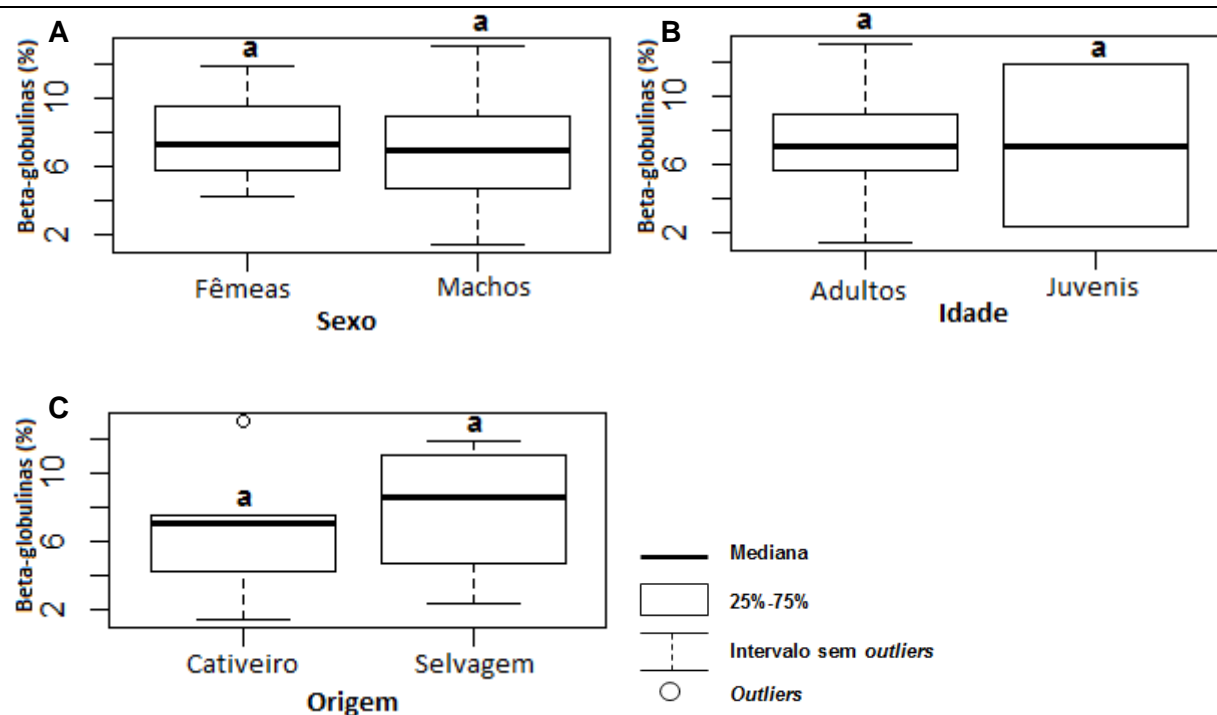
No Gráfico 17 A) encontra-se representada a percentagem das β -globulinas no soro em função do sexo. Pode observar-se que os resultados das β -globulinas são ligeiramente superiores nas fêmeas. Esta diferença pode ter-se devido à indução, pelo estrogénio, da síntese hepática de β -globulinas, em fêmeas reprodutivamente ativas (Hochleithner, 1994; van Wyk *et al.*, 1998). O teste de Wilcoxon realizado para comparação das medianas das β -globulinas entre os grupos considerados para a variável sexo mostrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre estes ($W=12$ e $p=0,83$; para $p<0,05$).

A percentagem das β -globulinas no soro segundo a idade dos indivíduos encontra-se representada no Gráfico 17 B), permitindo concluir que estes valores são semelhantes em adultos e juvenis. O teste de Wilcoxon confirmou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos considerados para a variável idade ($W=8$ e $p=1$; para $p<0,05$).

A análise da percentagem das β -globulinas no soro em função da origem dos indivíduos (Gráfico 17 C)) sugere que os animais selvagens apresentam valores superiores da fração β . Esta diferença poderá estar relacionada com a maior estimulação antigénica que os animais selvagens encontram na Natureza, em comparação com os animais de cativeiro que estão num ambiente controlado. Os animais pertencentes à amostra de animais selvagens poderão ter sofrido uma sensibilização dos seus sistemas imunitários, que conduziu a um aumento de algumas das proteínas de fase aguda que fazem parte da constituição da fração β das globulinas, causando a elevação desta. Outra explicação possível é a presença de hemólise na amostra e/ou a utilização de amostras lipémicas. Como já foi referido anteriormente, estão descritos aumentos artefactuais da fração β em amostras hemolisadas e/ou lipémicas (Cray *et al.*, 2007; Roman *et al.*, 2009a). Utilizando o teste de Wilcoxon para verificar a existência de diferenças na mediana dos valores das β -globulinas entre indivíduos selvagens e indivíduos cativos, concluiu-se que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos ($W=10$ e $p=0,76$; para $p<0,05$).

Os valores obtidos neste trabalho são inferiores aos resultados obtidos por Ordonneau *et al.* (2005) e por Tatum *et al.* (2000) para outros membros da ordem dos Accipitriformes. Estes autores utilizaram plasma, que como já foi referido anteriormente possui na sua constituição fibrinogénio, ao contrário do soro (material utilizado neste estudo). Este facto poderá explicar a diferença entre os valores obtidos neste trabalho e os valores obtidos nos referidos estudos.

Gráfico 17. Percentagem das β -globulinas no soro nos abutres-pretos em função do A) sexo, B) idade e C) origem. Nas fêmeas o n=3, nos machos o n=7, nos adultos o n=8, nos juvenis o n=2, nos cativos o n=6 e nos selvagens o n=4. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).

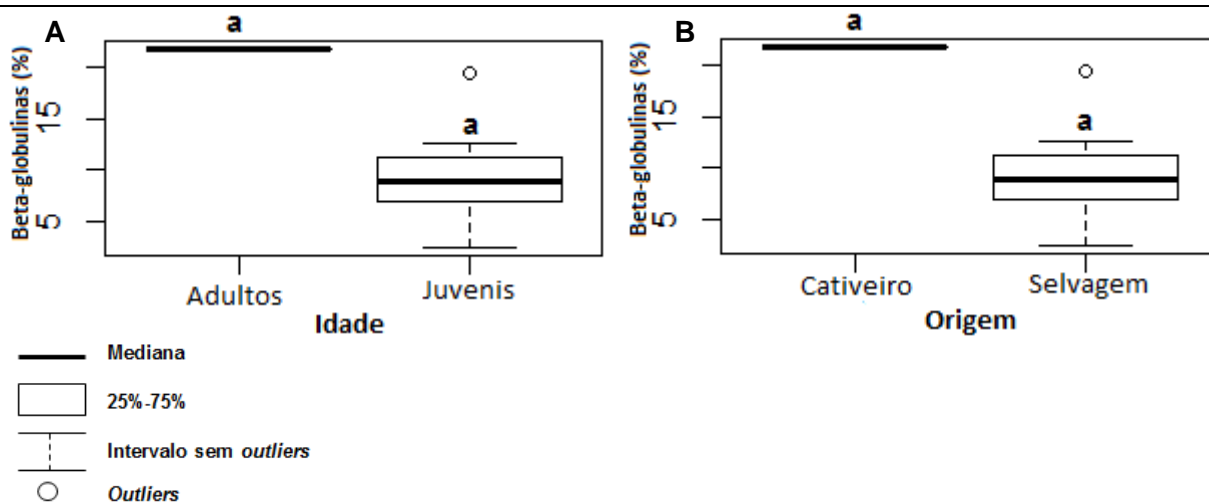


3.1.5.2 Grifo

A média dos valores das β -globulinas obtidos para amostra de grifos foi de $10,5 \pm 5,78$ %. Nos Gráficos 18 A) e 18 B) encontram-se representadas a percentagem das β -globulinas no soro segundo a idade e a origem, respetivamente. A sua análise sugere que os animais juvenis e selvagens apresentam valores relativos de β -globulinas inferiores, em comparação com os animais adultos e provenientes de cativeiro. No entanto, uma vez que o grupo de animais adultos e o grupo de animais cativos eram constituídos pelo mesmo individuo, não é possível tirar uma conclusão desta relação. A realização do teste de Wilcoxon permitiu concluir que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre adultos e juvenis ($W=10$ e $p=0,18$; para $p<0,05$), e entre aves selvagens e aves provenientes de cativeiro ($W=10$ e $p=0,18$; para $p<0,05$).

Os valores obtidos são inferiores a qualquer dos estudos realizados em grifos por Balasch *et al.* (1976) e Polo *et al.* (1992). No entanto, estes autores utilizaram plasma que, como já foi referido anteriormente, possui fibrinogénio na sua constituição.

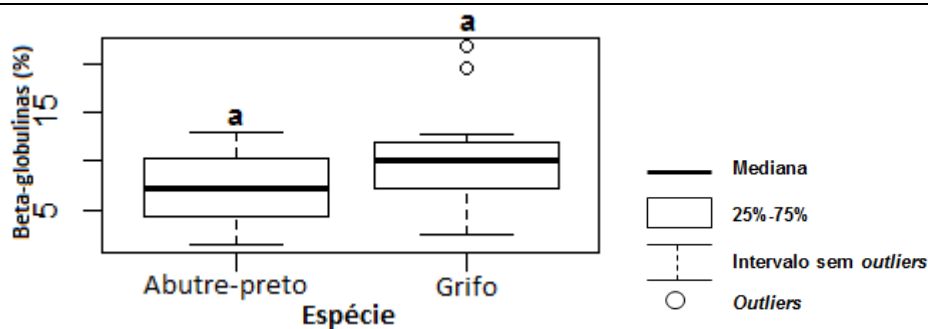
Gráfico 18. Percentagem das β -globulinas no soro nos grifos em função da A) idade e B) origem. Nos adultos o $n=1$, nos juvenis o $n=10$, nos cativos o $n=1$ e nos selvagens o $n=10$. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.5.3 Abutre-preto e grifo

A percentagem das β -globulinas no soro em função da espécie encontra-se representada no Gráfico 19. Esta permite observar que, para a amostra estudada, a espécie grifo apresenta valores percentuais de β -globulinas superiores. A realização de um teste de Wilcoxon demonstrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre as duas espécies ($W=35$ e $p=0,17$; para $p<0,05$).

Gráfico 19. Percentagem das β -globulinas no soro em função da espécie. Nos abutres-pretos o $n=10$ e nos grifos o $n=11$. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.6 γ -globulinas

3.1.6.1 Abutre-preto

A média dos valores das γ -globulinas obtidos para amostra de abutres-pretos foi de $7,9 \pm 5,46 \%$.

No Gráfico 20 A) encontra-se representada a percentagem das γ -globulinas no soro segundo o sexo. A sua análise sugere que as fêmeas apresentam valores percentuais de γ -globulinas superiores. O teste Wilcoxon realizado para a comparação das medianas das γ -globulinas entre os grupos considerados para a variável sexo mostrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre estes ($W=12$ e $p=0,83$; para $p<0,05$).). A bibliografia consultada é omissa em relação ao papel do sexo dos animais no nível de γ -globulinas. Uma explicação possível para a diferença verificada entre machos e fêmeas, é a presença de hemólise no soro dos animais do sexo feminino, uma vez que, como já foi referido anteriormente, a presença de hemólise nas amostras sanguíneas pode elevar artificialmente a fração γ das globulinas (Cray *et al.*, 2007; Roman *et al.*, 2009a). No entanto, visto que a diferença entre os dois sexos foi muito ténue, e não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas, esta hipótese é pouco crível.

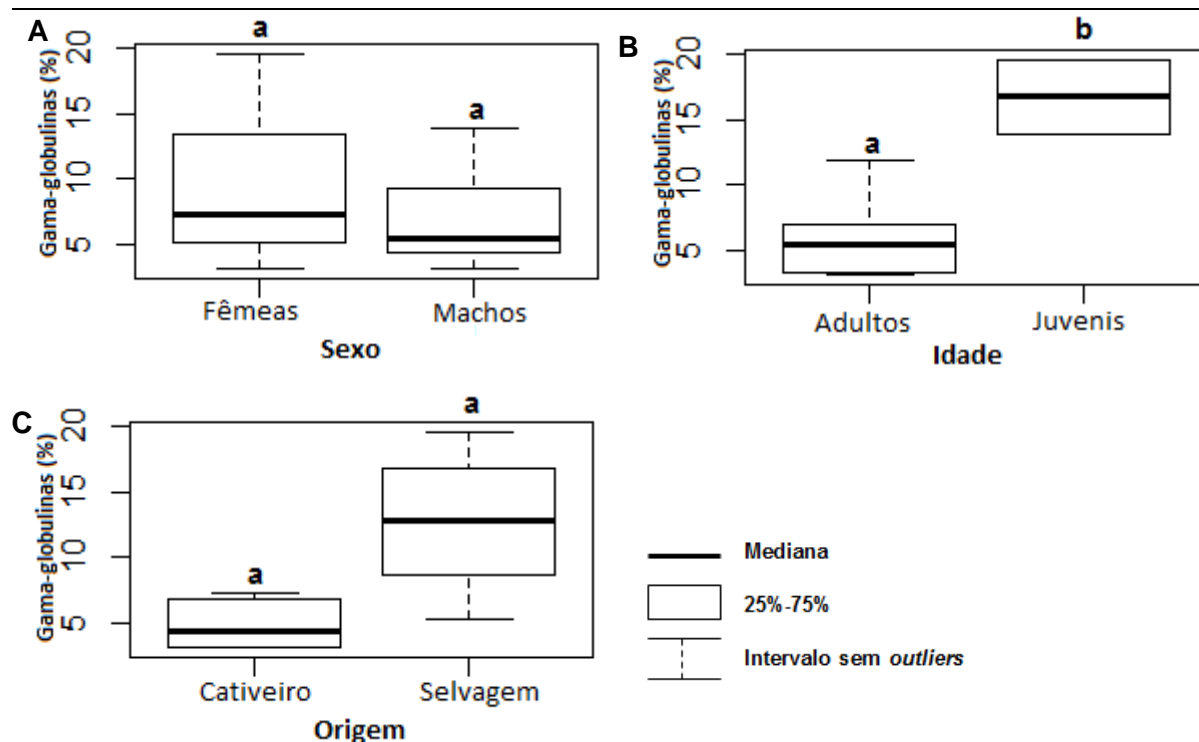
A percentagem das γ -globulinas no soro em função da idade (Gráfico 20 B)) sugere que os animais juvenis apresentam valores mais elevados de γ -globulinas que os animais adultos. Com o objetivo de verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de indivíduos com diferente idade, foi realizado um teste de Wilcoxon, concluindo-se que na amostra considerada existiam diferenças significativas entre os grupos relativamente aos valores relativos das γ -globulinas ($W=0$ e $p=0,04$; para $p<0,05$). Esta observação está em desacordo com o que se encontra descrito na literatura quanto à variação das γ -globulinas em função da idade. Como referido anteriormente, em comparação com as aves adultas as aves juvenis (com menos de 8 meses) apresentam níveis inferiores de γ -globulinas em circulação, ocorrendo um aumento progressivo destas à medida que o sistema imunitário do animal é sensibilizado (Cray *et al.*, 2007; van Wyk *et al.*, 1998).

A percentagem das γ -globulinas no soro em função da origem encontra-se representada no Gráfico 20 C). A sua análise revela que os animais selvagens tendencialmente apresentam níveis mais elevados de γ -globulinas que os animais provenientes de cativeiro. Possivelmente as aves selvagens sofreram uma sensibilização antigénica maior na Natureza que as aves cativas, que se encontravam num ambiente controlado (num centro de recuperação) onde eram tomadas medidas de profilaxia e higiene. A adicionar a este fator, a dieta rica em proteína à qual os animais em cativeiro estiveram sujeitos, pode igualmente ter contribuído para o menor nível de γ -globulinas apresentado por estas aves, uma vez que de acordo com um estudo realizado por Polat *et al.* (2004) uma alimentação com elevado teor proteico pode originar uma redução na concentração de γ -globulinas. A diferença encontrada entre os indivíduos selvagens e os indivíduos cativos pode explicar os

valores mais elevados de γ -globulinas encontrados nos animais juvenis, visto que este grupo era constituído unicamente por animais provenientes da Natureza, sugerindo ainda que o meio ambiente onde o animal se encontra desempenha um papel mais importante no seu nível de γ -globulinas que a sua idade. O teste de Wilcoxon para a comparação das medianas entre os grupos considerados para a variável origem mostrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os animais selvagens e os animais provenientes de cativeiro ($W=3$ e $p=0,07$; para $p<0,05$).

Comparativamente a outros membros da ordem dos Accipitriformes este estudo apresenta resultados semelhantes a Gelli *et al.* (2009); Ordonneau *et al.* (2005); Spagnolo *et al.* (2006) e Tatum *et al.* (2000).

Gráfico 20. Percentagem das γ -globulinas no soro nos abutres-pretos em função do A) sexo, B) idade e C) origem. Nas fêmeas $n=3$, nos machos $n=7$, nos adultos $n=8$, nos juvenis $n=2$, nos cativos $n=6$ e nos selvagens $n=4$. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



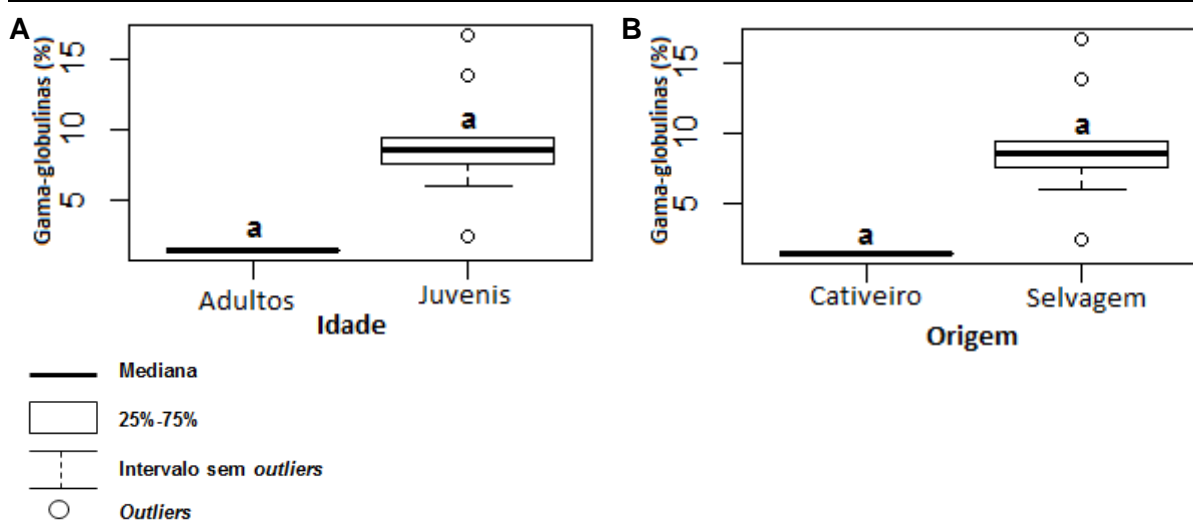
3.1.6.2 Grifo

A média dos valores das γ -globulinas obtidos para amostra de grifos foi de $8,3 \pm 4,41$ %.

A análise da percentagem das γ -globulinas no soro nos em função da idade (Gráfico 21 A)) e origem (Gráfico 21 B)) sugere que os animais juvenis e em estado selvagem apresentam um valor mais elevado de γ -globulinas que os animais mais velhos e provenientes de cativeiro. Foi encontrada a mesma relação nos abutre-pretos, porém, como já foi referido anteriormente devido ao número reduzido de animais que constitui o grupo de grifos jovens e provenientes de cativeiro, não podem ser inferidas ilações desta relação. A realização do teste de Wilcoxon permitiu concluir que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre adultos e juvenis ($W=0$ e $p=0,18$; para $p<0,05$), e entre aves selvagens e aves provenientes de cativeiro ($W=0$ e $p=0,18$; para $p<0,05$).

Os valores obtidos neste trabalho são semelhantes aos resultados obtidos noutros estudos realizados em grifos, nomeadamente a Balasch *et al.* (1976) e Polo *et al.* (1992).

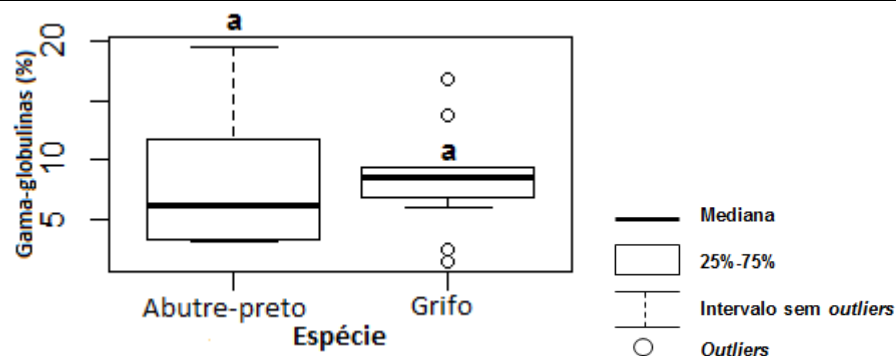
Gráfico 21. Percentagem das γ -globulinas no soro nos grifos em função da A) idade e B) origem. Nos adultos o $n=1$, nos juvenis o $n=10$, nos cativos o $n=1$ e nos selvagens o $n=10$. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.6.3 Abutre-preto e grifo

A percentagem das γ -globulinas no soro em função da espécie encontra-se representada no Gráfico 22, permitindo a sua observação verificar que os valores são ligeiramente mais elevados nos grifos. A realização de um teste de Wilcoxon demonstrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre as duas espécies ($W=45,5$ e $p=0,53$; para $p<0,05$).

Gráfico 22. Percentagem das γ -globulinas no soro em função da espécie. Nos abutres-pretos o n=10 e nos grifos o n=11. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.7 Rácio Albumina/Globulinas

3.1.7.1 Abutre-preto

A média dos A/G obtidos para amostra de abutres-pretos foi de $1,5 \pm 0,76$.

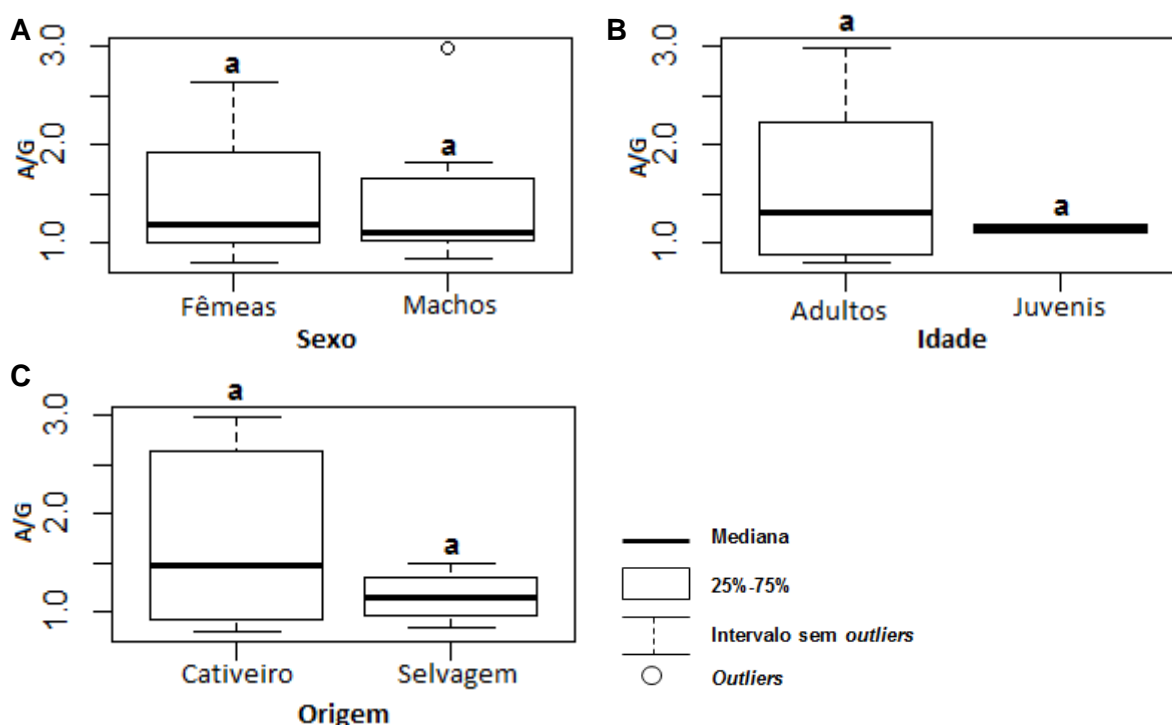
O A/G nos abutres-pretos em função do sexo encontra-se representado no Gráfico 23 A). Este permite observar que não existem diferenças acentuadas entre os dois sexos. O teste de Wilcoxon realizado para a comparação das medianas dos A/G entre os grupos considerados para a variável sexo, confirma não existirem diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($W=10$ e $p=1$; para $p<0,05$).

A análise do A/G segundo a idade (Gráfico 23 B)) permite observar que estes valores são ligeiramente mais elevados nas aves adultas. Esta observação está relacionada com o nível mais baixo de albumina e nível mais alto de globulinas encontrados nos indivíduos juvenis. Como já foi referido anteriormente, o valor mais baixo de albumina está relacionado com a maior exigência tecidual em proteínas e aminoácidos a que as aves em desenvolvimento estão sujeitas (Villegas *et al.*, 2002). Acresce a este fator, o facto da amostra de aves juvenis ser proveniente da natureza, onde os animais estão sujeitos a uma alimentação com menor teor proteico que aquela a que eram sujeitas as aves que se encontravam no GREFA. O valor mais alto de globulinas estará relacionado também com o facto dos indivíduos juvenis serem provenientes do estado selvagem, onde sofrem uma estimulação antigénica maior. Os valores mais elevados das frações α_2 e γ das globulinas nos animais juvenis, em comparação com as aves adultas, suportam esta hipótese. Os valores mais elevados de globulinas observados neste estudo estão em desacordo com que se encontra descrito por van Wyk *et al* (1998), que relatam um aumento das globulinas em função da idade. No entanto, estes autores também defendem que as aves provenientes da Natureza apresentam níveis superiores de globulinas comparativamente com as aves da mesma espécie provenientes de cativeiro, permitindo levantar a hipótese, que neste estudo o fator origem assumiu maior importância que o fator idade. O teste de Wilcoxon realizado para a comparação das medianas dos A/G, entre os grupos considerados para a variável idade mostrou não existirem diferenças significativas entre estes ($W=9$ e $p=0,89$; para $p<0,05$).

A análise da distribuição ordenada do A/G em função da origem dos indivíduos (Gráfico 23 C)) demonstra que os animais provenientes de cativeiro apresentam A/G superiores. Esta relação era esperada, uma vez que os animais cativos, como já foi referido anteriormente, estavam sujeitos a uma alimentação mais rica em proteína que os animais selvagens, o que provavelmente originou níveis de albumina superiores nas provenientes de cativeiro. Por outro lado, os indivíduos cativos apresentaram um nível inferior de globulinas, o que está de acordo com o se encontra descrito por van Wyk *et al.* (1998). A associação destes dois fatores foi responsável pelo A/G superior encontrado nos animais provenientes de cativeiro. A realização do teste de Wilcoxon permitiu concluir que não existiam diferenças entre aves selvagens e aves provenientes de cativeiro ($W=15$ e $p=0,61$; para $p<0,05$).

Comparativamente a outros membros da ordem dos Accipitriformes, os valores obtidos neste trabalho foram superiores a Ordonneau *et al.* (2005); Spagnolo *et al.* (2006) e Tatum *et al.* (2000). No entanto, todos estes estudos foram realizados com plasma sanguíneo, que origina valores mais elevados de β -globulinas. Este fator pode ser o responsável pela diferença encontrada.

Gráfico 23. Rácio albumina/globulinas nos abutres-pretos em função do A) sexo, B) idade e C) origem. Nas fêmeas o $n=3$, nos machos o $n=7$, nos adultos o $n=8$, nos juvenis o $n=2$, nos cativos o $n=6$ e nos selvagens o $n=4$. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



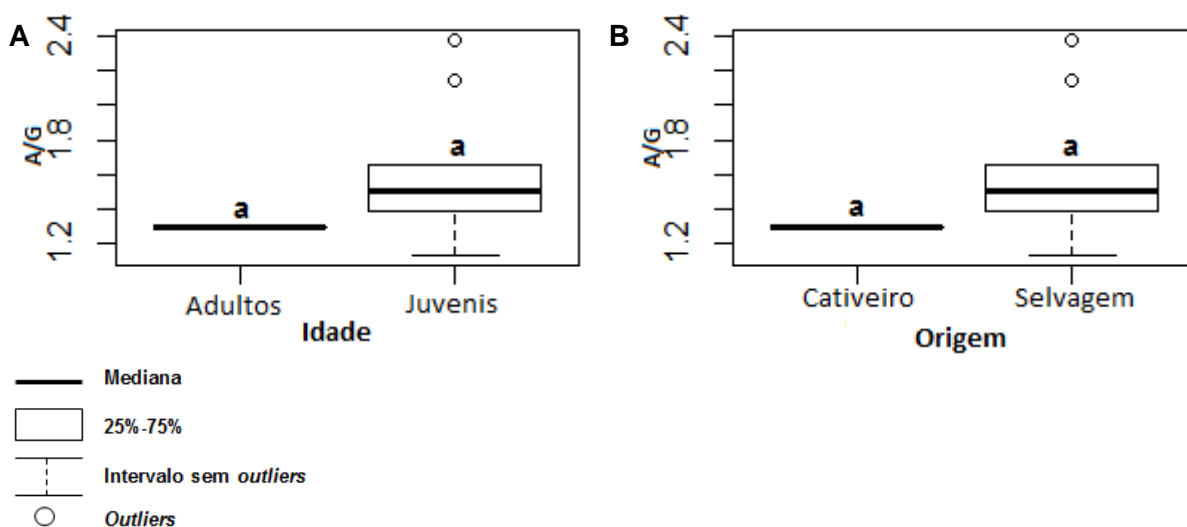
3.1.7.2 Grifo

A média dos A/G obtidos para amostra de grifos foi de $1,6 \pm 0,38$.

Nos Gráficos 24 A) e 24 B) encontram-se representados os A/G segundo a idade e origem, respetivamente. A sua análise sugere que os animais juvenis e selvagens apresentam A/G superiores. Esta relação representa o oposto do que foi encontrado nos abutres-pretos, e provavelmente deve-se ao número reduzido de indivíduos que compõe a amostra de animais adultos e cativos ($n=1$). A realização do teste de Wilcoxon permitiu concluir que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre adultos e juvenis ($W=2$ e $p=0,54$; para $p<0,05$), e entre os animais selvagens e animais provenientes de cativeiro ($W=2$ e $p=0,54$; para $p<0,05$).

Os valores obtidos são superiores a qualquer dos estudos realizados em grifos por Balasch *et al.* (1976) e Polo *et al.* (1992). No entanto, estes estudos foram realizados com plasma sanguíneo.

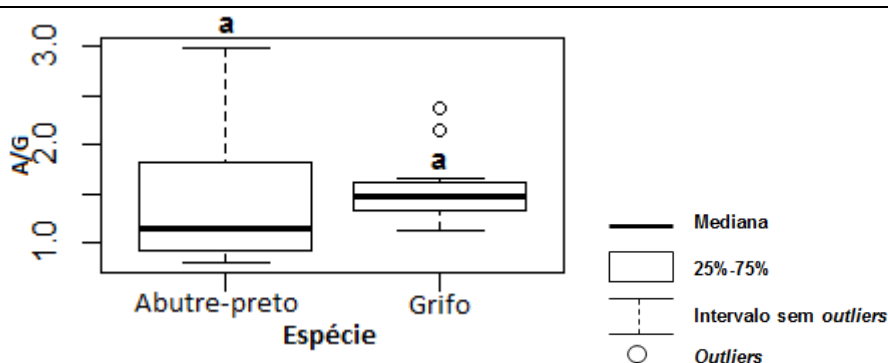
Gráfico 24. Rácio albumina/globulinas nos grifos em função da A) idade e B) origem. Nos adultos o $n=1$, nos juvenis o $n=10$, nos cativos o $n=1$ e nos selvagens o $n=10$. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.1.7.3 Abutre-preto e grifo

O A/G em função da espécie dos indivíduos encontra-se representado no Gráfico 25, permitindo concluir que na amostra estudada os A/G foram superiores na espécie grifo. No entanto, o teste de Wilcoxon mostrou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre as duas espécies ($W=38$ e $p=0,25$; para $p<0,05$).

Gráfico 25. Rácio albumina/globulinas em função da espécie. Nos abutres-pretos o n=10 e nos grifos o n=11. A caracteres diferentes correspondem diferenças significativas ($p<0,05$).



3.2 Limitações do estudo

Este trabalho experimental apresenta algumas limitações que poderão ter influenciado negativamente os resultados e por consequência as conclusões retiradas dos mesmos. Desde logo, o número reduzido de animais que compunham a amostra total e os diferentes grupos constituídos para as variáveis estudadas poderão ter impedido a obtenção de um maior número de diferenças estatisticamente significativas, e por consequência, de um maior número de conclusões. Este facto é particularmente evidente na espécie grifo, onde o grupo de animais adultos e provenientes de cativeiro é constituído por um único indivíduo.

Seria também desejável, existir uma maior uniformidade dentro dos grupos formados, de forma a melhor avaliar a influência que uma variável isolada exerce nos resultados finais das diferentes frações eletroforéticas e da concentração proteica total.

A impossibilidade de realizar análises bioquímicas nos grifos constituiu igualmente um importante condicionalismo, uma vez que impediu de aferir se existiam alterações do foro hepático e renal que, como já foi referido anteriormente, alteram o traçado eletroforético.

A inexistência de um protocolo de eletroforese em acetato de celulose especialmente adaptado a aves, e a necessidade de utilizar um protocolo de eletroforese de medicina humana poderão também ter tido influência nos resultados deste estudo, bem como o método de colheita, uma vez que este variou consoante o operador.

Finalmente, a excitabilidade dos indivíduos pode também ter influenciado os resultados, contudo este fator estará sempre presente em estudos realizados em animais silvestres.

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

No presente estudo foi realizada uma caracterização do proteinograma sérico de duas espécies de aves de rapina diurnas, o abutre-preto (*Aegypius monachus*) e o grifo (*Gyps fulvus*). Verificou-se para ambas as espécies que os valores de PT determinados se encontravam acima dos limites que estão descritos para algumas das espécies de aves de rapina. No que diz respeito às diferentes frações eletroforéticas, os valores determinados neste estudo são concordantes com valores referidos na literatura para algumas espécies de aves de rapina.

Relativamente aos abutres-pretos e à influência do sexo na concentração sérica da proteína total e nos resultados eletroforéticos, os resultados sugeriram que as fêmeas desta espécie apresentam uma concentração proteica superior, bem como dos valores percentuais da albumina e das frações α_2 , β , e γ das globulinas. Pelo contrário a fração α_1 é superior nos machos. Já o A/G é semelhante nos dois sexos.

Em relação à influência da idade nos resultados eletroforéticos da espécie abutre-preto, os resultados sugeriram que aves adultas desta espécie apresentam valores relativos de albumina e α_1 -globulinas mais elevados que as aves juvenis, o A/G é também mais elevado nas aves adultas. Por outro lado, os animais juvenis apresentam valores percentuais de α_2 -globulinas e γ -globulinas mais elevados que os animais adultos, não existindo diferenças nos valores relativos de β -globulinas entre animais de diferentes idades. Os resultados foram ainda sugestivos de existir um aumento no valor de proteínas totais com a idade.

No que toca à proveniência dos animais, os resultados foram sugestivos de um aumento no A/G e nos valores percentuais de albumina e α_1 -globulinas e, uma redução nos valores relativos das frações α_2 , β e γ das globulinas e nos níveis de proteínas totais com o cativo.

No que diz respeito ao grifo e à influência da idade e da proveniência nos parâmetros eletroforéticos, os resultados foram sugestivos de um aumento nos valores relativos das α_2 e β -globulinas e, uma redução no A/G, nos níveis de proteínas totais e nos valores percentuais de albumina, α_1 e γ -globulinas com a idade e com o cativo.

No que toca a diferenças encontradas entre as duas espécies estudadas, é possível concluir que os grifos apresentam, em relação aos abutres-pretos, uma concentração de PT superior. Os resultados obtidos sugeriram ainda que os grifos apresentam valores percentuais de albumina, β e γ -globulinas superiores, bem como um A/G maior. Já os abutres pretos apresentam uma fração α_1 mais elevada.

Em relação à determinação das proteínas totais é possível concluir que a refratometria origina uma sobrestimação da concentração plasmática, devendo esta ser utilizada apenas como método alternativo, quando não é possível realizar a determinação deste parâmetro pelo método do biureto ou por eletroforese.

Como já foi referido, este estudo apresenta algumas limitações que poderão ter influenciado negativamente as conclusões do mesmo. Sendo assim, em estudos posteriores seria importante aumentar a dimensão da amostra. Seria também desejável utilizar grupos mais homogêneos de modo a melhor estudar a influência que cada variável (sexo, idade e estado) por si só exerce nos resultados eletroforéticos. O ideal seria constituir grupos que das três variáveis em estudo, duas fossem constantes de forma a avaliar a influência da terceira. Seria também importante a constituição de um maior número de grupos para cada variável em estudo, de modo a diminuir a diferença entre os indivíduos que se encontram no limite inferior e os indivíduos que se encontram no limite superior do grupo. Futuros estudos poderiam beneficiar também da utilização de plasma como material de amostra, devido ao significado clínico que o fibrinogénio detém. Finalmente, a criação de um protocolo eletroforético especificamente adaptado à classe das aves poderá levar à obtenção de resultados mais fidedignos.

Embora tenham existido alguns desenvolvimentos durante a última década na medicina de aves, em particular das características hematológicas, bioquímicas e eletroforéticas de diversas espécies, continua a existir uma grande escassez de informação no que diz respeito à maioria de espécies que ingressam nos centros de recuperação de fauna silvestre. É então imperativo a realização de mais estudos em animais silvestres, de modo a auxiliar o clínico desta área na realização do diagnóstico e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

Bibliografia

- Adelman, J. S., Bentley, G. E., Wingfield, J. C., Martin, L. B. & Hau, Michaela (2010). Population differences in fever and sickness behaviors in a wild passerine: a role for cytokines. *The Journal of Experimental Biology*, 213, 4099-4109.
- Adler, K. L., Peng, P. H., Peng, R. K. & Klasing, K. C. (2001). The kinetics of hemopexin and alpha1-acid glycoprotein levels induced by injection of inflammatory agents in chickens [abstract]. *Avian Diseases*, 45, 289-296.
- Andreasen, J. R., Andreasen, C. B., Sonn, A. B. & Robeson, D. C. (1996). The effects of haemolysis on serum chemistry measurements in poultry. *Avian Pathology*, 25, 519-536.
- Anraku, M., Yamasaki, K., Maruyama, T., Kragh-Hansen, U. & Otagiri, M. (2001). Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharmaceutical Research*, 18, 632-639.
- Archer, F. J. & Battison, A. L. (1997). Differences in electrophoresis patterns between plasma albumins of the cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and the chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Avian Pathology*, 26, 865-870.
- Artés, J. J. (2004). Buitre negro *Aegypius monachus*. In A. Madroño, C. González & J. C. Atienza (Eds), *Libro rojo de las aves de España*. (pp. 134-138). Madrid: Dirección General para la Biodiversidad – SEO/Birdlife.
- Balasch, J., Musquera, S., Palacios, L., Jimenez, M. & Palomeque, J. (1976). Comparative hematology of some falconiforms. *The Condor*, 78, 258-259.
- Barnes, D. M., Song, Z., Klasing, K. C. & Bottje, W. (2002). Protein metabolism during an acute phase response in chickens. *Amino Acids*, 22, 15-26.
- Berzins, L. L., Gilchrist, H. G., Matson, K. D. & Burness, G. (2010). Sex-specific effects of increased incubation demand on innate immunity in Black Guillemots. *Physiological and Biochemical Zoology*, 84, 222-229.
- Birdlife International. (1996). *Action plan for the Cinereous Vulture (Aegypius monachus) in Europe*. United Kingdom: Borja Herdia (Birdlife International, U.K.).
- BirdLife International. (2004). *Birds in Europe: Population Estimates, Trends and Conservation Status*. BirdLife Conservation Series nº 10, BirdLife International, Cambridge.
- Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Buehler, D. M., Encinas-Viso, F., Petit, M., Vézina, F., Tieleman, B. I. & Piersma, T. (2009). Limited access to food and physiological trade-offs in a long-distance migrant

shorebird. II. Constitutive immune function and the acute-phase response. *Physiological and biochemical zoology*, 82, 561-571.

Campbell, T. W. (2006). Clinical chemistry of birds. In M. A. Thrall, D. C. Baker, T. W. Campbell, D. DeNicola, M. J. Fettman, E. D. Lassen, A. Rebar & G. Weiser (Eds.), *Veterinary hematology and clinical chemistry*. (pp. 479-492). Iowa: Blackwell Publishing.

Cardinali, B., Profumo, A., Aprile, A., Byron, O., Morris, G., Harding, S. E., Stafford, W. F. & Rocco, M. (2010). Hydrodynamic and mass spectrometry analysis of nearly-intact human fibrinogen, chicken fibrinogen, and of a substantially monodisperse human fibrinogen fragment X. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 493, 157-168.

Carlevaro, M. F., Albin, A., Ribatti, D., Gentili, C., Benelli, R., Cermelli, S., Cancedda, R. & Cancedda, F. D. (1997). Transferrin promotes endothelial cell migration and invasion: implication in cartilage neovascularization. *The Journal of Cell Biology*, 136 (6), 1375-1384.

Carroll, M. C. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology*, 5 (10), 981-986.

Céron, J. J. & Martínez-Subiela, S. (2004). An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. *Veterinary Research*, 35, 671-679.

Céron, J. J., Eckersall, P. D. & Martínez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(2), 85-99.

Chamanza, R., Toussaint, M. J., van Veen, L., Hulskamp-Koch, C. & Fabri, T. H. (1999). Serum amyloid A and transferrin in chicken. A preliminary investigation of using acute-phase variables to assess diseases in chickens. *Veterinary Quarterly*, 21, 158-162.

Chang, L., Munro, S. L., Richardson, S. J. & Schreiber, G. (1999). Evolution of thyroid hormone binding by transthyretins in birds and mammals. *European Journal of Biochemistry*, 259, 534-542.

Choi, Y. S. & Good, R. A. (1971). New immunoglobulin-like molecules in the serum of bursectomized-irradiated chickens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(9), 2083-2086.

Choi, J. W., Kim, J.-K., Seo, H. W., Cho, B. W., Song, G. & Han, J. Y. (2010). Molecular cloning and comparative analysis of immunoglobulin heavy chain genes from *Phasianus colchicus*, *Meleagris gallopavo*, and *Coturnix japonica*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 136, 248-256.

Cray, C. & Tatum, L. M. (1998). Applications of protein electrophoresis in avian diagnostics. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 12(1), 4-10.

Cray, C., Rodriguez, M. & Zaias, J. (2007). Protein electrophoresis of psittacine plasma. *Veterinary Clinical Pathology*, 36(1), 64-72

- Cray, C., Rodriguez, M. & Arheart, K. L. (2008). Use of refractometry for determination of psittacine plasma protein concentration. *Veterinary Clinical Pathology*, 37(4), 438-442.
- Cray, C., Zaias, J. & Altman, N. H. (2009a). Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comparative Medicine*, 59(6), 517-526.
- Cray, C., Reavill, D., Romagnano, A., Van Sant, F., Champagne, D., Stevenson, R., Rolfe, V., Griffin, C. & Clubb, S. (2009b). Galactomannan assay and plasma protein electrophoresis findings in psittacine birds with aspergillosis. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 23 (2), 125-135.
- Crouguennec, T., Nau, F., Pezennec, S., Piot, M. & Brulé, G. (2001). Two-step chromatographic procedure for the preparation of hen egg white ovotransferrin. *European Food Research and Technology*, 212, 296-301.
- Davison, F., Magor, K. E. & Kaspers, B. (2008). Structure and evolution of avian immunoglobulins. In F. Davison, B. Kaspers & K. A. Schat (Eds.), *Avian immunology*. (pp. 107-127). San Diego: Academic Press.
- De la Puente, J., Moreno-Opo, R. & Del Moral, J. C. (2007). *El buitre negro en España Censo nacional (2006)*. Madrid: SEO/BirdLife.
- Decreto-Lei n.º 49/2005 de 24 de Fevereiro. Diário da República nº39 – Série I-A. Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território. Lisboa
- Decreto-Lei n.º 103/80 de 11 de Outubro. Diário da República nº236 – Série I. Ministério dos Negócios Estrangeiros, Direção Geral dos Negócios Económicos. Lisboa
- Decreto-Lei n.º 114/90 de 5 de Abril. Diário da República nº80 – Série I. Ministério do Planeamento e da Administração. Lisboa
- Decreto-Lei n.º 140/99 de 24 de Abril. Diário da República nº96 – Série I-A. Ministério do Ambiente. Lisboa
- Decreto-Lei n.º 316/89 de 22 de Setembro. Diário da República nº219 – Série I. Ministério do Planeamento e da Administração. Lisboa
- Del Hoyo, J., Elliott, A. & Sargatal, J. (1994). *Handbook of the birds of the world (Volume 2): New world vultures to Guinea-fowl*. Barcelona: Lynx Edicions.
- Del Moral, J. C. (2009). *El buitre leonado en España. Población reproductora en 2008 y método de censo*. Madrid: SEO/BirdLife.
- Dobado-Berrios, P. M., Tella, J. L., Ceballos, O. & Donazar, J. A. (1998). Effects of age and captivity on plasma chemistry values of the egyptian vulture. *The Condor*, 100, 719-725.
- Doolittle, R. F., Spraggon, G. & Everse, S. J. (1998). Three-dimensional structural studies on fragments of fibrinogen and fibrin. *Current Opinion in Structural Biology*, 8, 792-798.

- Driver, E. A. (1981). Hematological and blood chemical values of mallard, *Anas p. platyrhynchos*, drakes before, during and after remige moult. *Journal of Wildlife Diseases*, 17(3), 413-420.
- Du Clos, T. W. & Mold, C. (2001). The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection [Abstract]. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 14(3), 289-293.
- Dubin, S. & Hunt, P. (1978). Effect of anticoagulants and glucose on refractometric estimation of protein in canine and rabbit plasma. *Laboratory Animal Science*, 28, 541-544.
- Eckersall, P. D. (2000). Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151(7), 577-584.
- Eckersall, P. D., Young, F. J., McComb, C., Hogarth, C. J., Safi, S., Fitzpatrick, J. L., Nolan, A. M., Weber, A. & McDonald, T. (2001). Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis [abstract]. *Veterinary Record*, 148(2), 35-41.
- Eckersall, D. P. (2008). Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In J. J. Kaneko, J. W. Harvey & M. L. Bruss (Eds.), *Clinical biochemistry of domestic animals* (6th ed.). (pp. 117-155). San Diego, California: Academic Press.
- Eckersall, P. D. & Bell, R. (2010). Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, 185, 23-27.
- European Raptors Biology and Conservation. (2012). Eurasian griffon vulture, *Gyps fulvus*. Acedido em Agosto 13, 2012, disponível em: http://www.europeanraptors.org/raptors/eurasian_griffon_vulture.html
- Evans, T. W. (2001). Review article: albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16(5), 6-11.
- Ferrer, M. & Dobado-Berrios, P. (1998). Factors affecting plasma chemistry values of the Spanish Imperial Eagle, *Aquila adalberti*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 120, 209-217.
- Fournier, T., Medjoubi-N, N. & Porquet, D. (2000). Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1482, 157-171.
- Fudge, A. M. (2000). In A. M. Fudge (Ed.), *Laboratory medicine: avian and exotic pets*. Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Fudge, A. M. & Speer, B. (2001). Selected controversial topics in avian diagnostic testing. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 10(2), 96-101.
- Gahmberg, C. G. & Andersson, L. C. (1978). Leucocyte surface origin of human α 1-acid glycoprotein (orosomucoid). *The Journal of Experimental Medicine*, 148, 507-521.

- Galindo-Muniz, F., Calderon, N. L., Charles, M. N., Tellez, I. G. & Fortoul, T. I. (2001). Haematological and histological findings in experimental Newcastle disease. *Acta Veterinaria Brno*, 70, 185-189.
- Gelli, D., Ferrari, V., Franceschini, F., Lai, O., Laricchiuta, P., Zanella, A., Bernardini, D. & Romagnoli, S. (2009). Serum biochemistry and electrophoretic patterns in the Eurasian buzzard (*Buteo buteo*): reference values. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(3), 828-833.
- George, J. W. (2001). The usefulness and limitations of hand-held refractometers in veterinary laboratory medicine: an historical and technical review. *Veterinary Clinical Pathology*, 30(4), 201-210.
- Gershwin, L. J. (2008). Clinical veterinary immunology. In J. J. Kaneko, J. W. Harvey & M. L. Bruss (Eds.), *Clinical biochemistry of domestic animals* (6th ed.). (pp. 157-172). San Diego, California: Academic Press.
- Glick, B. (1999). Immunophysiology. In G. C. Whittow (Ed.), *Sturkie's avian physiology* (5th ed.). (pp. 657-670). San Diego: Academic Press.
- Grienering, G., Liang, T. J., Beuving, G., Goldfarb, V., Metcalfe, S. A. & Muller-Eberhard, U. (1986). Hemopexin is a developmentally regulated, acute-phase plasma protein in the chicken. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(33), 15719-15724.
- Gruys, E., Toussaint, M. J., Upragarin, N., van Ederen, A. M., Adewuyi, A. A., Candiani, D., Nguyen, T. K. A. & Sabeckiene (Balciute), J. (2005a). Acute phase reactants, challenge in the near future of animal production and veterinary medicine. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 6B(10), 941-947.
- Gruys, E., Toussaint, M. J., Niewold, T. A. & Koopmans, S. J. (2005b). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 6B(11), 1045-1056.
- Gruys, E., Toussaint, M. J., Niewold, T. A., Koopmans, S. J., van Dijk, E. & Meloen, R. H. (2006). Monitoring health by values of acute phase proteins. *Acta Histochemica*, 108, 229-232.
- Guo, J.-T., Aldrich, C. E., Mason, W. S. & Pugh, J. C. (1996). Characterization of serum amyloid A protein mRNA expression and secondary amyloidosis in the domestic duck. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 14548-14553.
- Hari-Dass, R., Shah, C., Meyer, D. J. & Raynes, J. G. (2005). Serum amyloid A protein binds to outer membrane protein A of gram-negative bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18562-18567.
- Harr, K. E. (2006). Biochemistry. In G. J. Harrison, & T. L. Lightfoot (Eds.), *Clinical avian medicine (Volume I)*. (pp. 611-629). Florida: Spix Publishing.
- Harris, D. J. (2000). Clinical tests. In T. N. Tully Jr., G. M. Dorrestein & A. K. Jones (Eds.), *Handbook of Avian Medicine* (2nd ed.). (pp. 43-51). Oxford: Saunders.

- Hartup, B. K. & Schroeder, C. A. (2006). Protein electrophoresis in cranes with presumed insect bite hypersensitivity. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(2), 226-230.
- Hawkey, C. & Hart, M. G. (1988). An analysis of the incidence of hyperfibrinogenaemia in birds with bacterial infections. *Avian Pathology*, 17, 427-432.
- Heinrich, C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical Journal*, 334, 297-314.
- Heinrich, C., Castell, J. V. & Andus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical Journal*, 265, 621-636.
- Hernández, M. & Margalida, A. (2010). Hematology and blood chemistry reference values and age-related changes in wild bearded vultures (*Gypaetus barbatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 46(2), 390-400.
- Higgins, D. A. & Warr, G. W. (1993). Duck immunoglobulins: structure, functions and molecular genetics. *Avian Pathology*, 22, 211-236.
- Hochleithner, M. (1994). Biochemistries. In B. W. Ritchie, G. J. Harrison & L. R. Harrison (Eds.), *Avian medicine: principles and application*. (pp. 223-45). Florida: Wingers Publishing.
- Holt, P. S. & Gast, R. K. (2002). Comparison of the effects of infection with *Salmonella enteritidis*, in combination with an induced molt, on serum levels of the acute phase protein, α 1 Acid Glycoprotein, in hens. *Poultry Science*, 81(9), 1295-1300.
- Huang, T., Zhang, M., Wei, Z., Wang, P., Sun, Y., Hu, X., Ren, L., Meng, Q., Zhang, R., Guo, Y., Hammarstrom, L., Li, N. & Zhao, Y (2012). Analysis of immunoglobulin transcripts in the ostrich *Struthio camelus*, a primitive avian species. *PLoS ONE*, 7(3), 1-10.
- Ibrahim, H. R., Sugimoto, Y. & Aoki, T. (2000). Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1523, 196-205.
- ICNB (2006a). Plano sectorial da rede natura 2000. Acedido em Agosto 10, 2012, disponível em: http://www.icn.pt/psrn2000/caracterizacao_valores_naturais/FAUNA/AVES/Aegypius%20monachus.pdf
- ICNB (2006b). Plano sectorial da rede natura 2000. Acedido em Agosto 10, 2012, disponível em: <http://www.icnb.pt/propfinal/ Vol.%20II-Valores%20Naturais/Fichas%20de%20caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20ecol%C3%B3gica%20e%20de%20gest%C3%A3o/Fauna/Aves/Gyps%20fulvus.pdf>
- ICNB (2008a). Abutre-preto *Aegypius monachus*. In ICNB, *Livro vermelho dos vertebrados de Portugal* (3ª edição). (pp. 215-216). Lisboa: Assírio & Alvim.

- ICNB (2008b). Grifo *Gyps fulvus*. In ICNB, *Livro vermelho dos vertebrados de Portugal* (3ª edição). (pp. 213-214). Lisboa: Assírio & Alvim.
- Ikenoue, N., Saitsu, Y., Shimoda, M. & Kokue, E. (2000). Disease-induced alterations in plasma drug-binding proteins and their influence on drug binding percentages in dogs. *Veterinary Quarterly*, 22(1), 43-49.
- Israili, Z. H. & Dayton, P. G. (2001). Human alpha-1-glycoprotein and it's interactions with drugs. *Drug Metabolism Reviews*, 33(2), 161-235.
- IUCN (2004). The IUCN red list of threatened species. Acedido em Agosto 13, 2012, disponível em: <http://www.iucnredlist.org/search>
- Ivanyi, J. (1975). Immunodeficiency in the chicken II. Production of monomeric IgM following testosterone treatment or infection with Gumboro disease. *Immunology*, 28, 1015-1021.
- Jensen, L. E. & Whitehead, A. S. (1998). Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase. *Biochemical Journal*, 334, 489-503.
- Johnson, R. W. (1997). Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. *Journal of Animal Science*, 75, 1244-1255.
- Johnson, R. W., Curtis, S. E., Dantzer, R. & Kelley, K. W. (1993). Central and peripheral prostaglandins are involved in sickness behavior in birds [abstract]. *Physiology and Behavior*, 53(1), 127-131.
- Juul-Madsen, H. R., Munch, M., Handberg, K. J., Sørensen, P., Johnson, A. A., Norup, L. R., & Jorgensen, P. H. (2003). Serum levels of mannan-binding lectin in chickens prior to and during experimental infection with avian infectious bronchitis virus. *Poultry Science*, 82, 235-241.
- Juul-Madsen, H., Viertlboeck, B., Smith, A. L. & Göbel, T. W. (2008). Avian innate immune responses. In F. Davison, B. Kaspers & K. A. Schat (Eds.), *Avian immunology*. (pp. 129-158). San Diego: Academic Press.
- Kaiser, P. & Stäheli, P. (2008). Avian cytokines and chemokines. In F. Davison, B. Kaspers & K. A. Schat (Eds.), *Avian immunology*. (pp. 203-22). San Diego: Academic Press.
- Kaiser, P., Rothwell, L., Galyov, E. E., Barrow, P. A., Burnside, J. & Wigley, P. (2000). Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. *Microbiology*, 146, 3217-3226.
- Kaiser, P., Rothwell, L., Goodchild, M. & Bumstead, N. (2004). The chicken proinflammatory cytokines interleukin-1 β and interleukin-6: differences in gene structure and genetic location compared with their mammalian orthologues. *Animal Genetics*, 35, 169-175.

- Karcher, R. E. & Landers, J. P. (2006). Electrophoresis. In C. A. Burtis, E. R. Ashwood & D. E. Bruns (Eds.), *Tietz fundamentals of clinical chemistry* (6th ed.). (pp. 102-111). Philadelphia: W. B. Saunders.
- Klasing, K. C. & Korver, D. R. (1997). Leukocytic cytokines regulate growth rate and composition following activation of the immune system. *Journal of Animal Science*, 75, 58-67.
- Knolle, P., Löhr, H., Treichel, U., Dienes, H., Lohse, A., Schlaack, J. & Gerken, G. (1995). Parenchymal and nonparenchymal liver cells and their interaction in the local immune response [abstract]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 33(10), 613-620.
- Kovács, B. M., Toussaint, M. J., Gruys, E., Fábian, I. B., Szilágyi, L., Janan, J. & Rudas, P. (2007). Evaluation of goose serum amyloid A acute phase response by enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Veterinaria Hungarica*, 55(3), 349-357.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lanzarot, M. d., Montesinos, A., San Andrés, M. I., Rodríguez, C. & Barahona, M. V. (2001). Hematological, protein electrophoresis and cholinesterase values of free-living nestling peregrine falcons in Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(1), 172-177.
- Lanzarot, M. P., Barahona, M. V., San Andrés, M. I., Fernández-García, M. & Rodríguez, C. (2005). Hematological, protein electrophoresis and cholinesterase values of free-living black stork nestlings (*Ciconia nigra*). *Journal of Wildlife Diseases*, 41(2), 379-386.
- Lassen, E. D. (2006). Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. In M. A. Thrall, D. C. Baker, T. W. Campbell, D. DeNicola, M. J. Fettman, E. D. Lassen, A. Rebar & G. Weiser (Eds.), *Veterinary hematology and clinical chemistry*. (pp. 401-415). Iowa: Blackwell Publishing.
- Laursen, S. B. & Nielsen, O. L. (2000). Mannan-binding lectin (MBL) in chickens: molecular and functional aspects. *Developmental and Comparative Immunology*, 24, 85-101.
- Laursen, S. B., Hedemand, J. E., Nielsen, O. L., Thiel, S., Koch, C. & Jensenius, J. C. (1998). Serum levels, ontogeny and heritability of chicken mannan-binding lectin (MBL). *Immunology*, 94, 587-593.
- Lebacqz-Verheyden, A.-M., Vaerman, J. P. & Heremans, J. F. (1974). Quantification and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions. *Immunology*, 27, 683-692.
- Leshchinsky, T. V. & Klasing, K. C. (2001). Divergence of the inflammatory response in two types of chickens. *Development and Comparative Immunology*, 25, 629-638.
- Leshchinsky, T. V. & Klasing, K. C. (2003). Profile of chicken cytokines induced by lipopolysaccharide is modulated by dietary α -tocopheryl acetate. *Poultry Science*, 82, 1266-1273.

- Leslie, G. A. & Clem, L. W. (1969). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *The Journal of Experimental Medicine*, 130, 1337-1352.
- Leveille, G. A. & Sauberlich, H. E. (1961). Influence of dietary protein level on serum protein components and cholesterol in the growing chick. *The Journal of Nutrition*, 74, 500-504.
- Lim, W., Jeong, W., Kim, J.-H., Lee, J.-Y., Kim, J., Bazer, F. W., Han, J. Y. & Song, G. (2011). Differential expression of alpha 2 macroglobulin in response to diethylstilbestrol and in ovarian carcinomas in chickens. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 137(9), 1-10.
- Lin, Y., Rajala, M. W., Berger, J. P., Moller, D. E., Barzilai, N. & Scherer, P. E. (2001). Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42077–42083.
- Lippi, G., Salvagno, G. L., Montagnana, M., Brocco, G. & Guidi, G. C. (2006). Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44(3), 311-316.
- Litman, G. W., Rast, J. P., Shamblott, M. J., Haire, R. N., Hulst, M., Roess, W., Litman, R. T., Hinds-Frey, K. R., Zilch, A. & Amemiya, C. T. (1993). Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Molecular Biology and Evolution*, 10(1), 60-72.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lumeij, J. T. & de Bruijne, J. J. (1985). Evaluation of the refractometric method for the determination of total protein in avian plasma or serum. *Avian Pathology*, 14, 441-444.
- Lumeij, J. T. (1987). The diagnostic value of plasma proteins and non-protein nitrogen substances in birds. *The Veterinary Quarterly*, 9(3), 262-268.
- Lumeij, J. T., de Bruijne, J. J. & Kwant, M. M. (1990). Comparison of different methods of measuring protein and albumin in pigeon sera. *Avian Pathology*, 19, 255-261.
- Lumeij, J. T. & Overduin, L. M. (1990). Plasma chemistry references values in psittaciformes. *Avian Pathology*, 19, 235-244.
- Lumeij, J. T. (2008). Avian clinical biochemistry. In J. J. Kaneko, J. W. Harvey & M. L. Bruss (Eds.), *Clinical biochemistry of domestic animals* (6th ed.). (pp. 839-72). San Diego, California: Academic Press.
- Lundqvist, M. L., Middleton, D. L., Radford, C., Warr, G. W. & Magor, K. E. (2006). Immunoglobulins of the non-galliform birds: antibody expression and repertoire in the duck. *Developmental and Comparative Immunology*, 30, 93-100.

- Lynagh, G. R. & Kaiser, P. (2000). Interleukin-6 is produced during both murine and avian *Eimeria* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 76, 89-102.
- Magor, K. E., Warr, G. W., Bando, Y., Middleton, D. L. & Higgins, D. A. (1998). Secretory immune system of the duck (*Anas platyrhynchos*). Identification and expression of the genes encoding IgA and IgM heavy chains. *European Journal of Immunology*, 28, 1063-1068.
- Martin, L. B., Alam, J. L., Imboma, T. & Liebl, A. L. (2010). Variation in inflammation as a correlate of range expansion in kenyan house sparrows. *Oecologia*, 164, 339-347.
- Mazur-Gonkowska, B., Koncicki, A. & Krasnodebska-Depta, A. (2004). Assessment of acute phase response in turkeys experimentally infected with *Escherichia coli* or haemorrhagic enteritis virus. *The Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 48, 19-23.
- McSherry, B. J. & Al-Baker, J. (1976). Comparison of total serum protein determined by T/S meter and biuret technique. *Bulletin of the American Society of Veterinary Clinical Pathologists*, 3, 4-12.
- Mold, C., Rodriguez, W., Rodic-Polic, B. & Du Clos, T. W. (2002). C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with FcγR. *The Journal of Immunology*, 169, 7019-7025.
- Murata, H., Shimada, N. & Yoshioka, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, 168, 28-40.
- Nakajou, K., Watanabe, H., Kragh-Hansen, U., Maruyama, T. & Otagiri, M. (2003). The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1623, 88-97.
- Nakamura, K., Imai, K. & Tanimura, N. (1996). Comparison of the effects of infectious bronchitis and infectious laryngotracheitis on the chicken respiratory tract. *Journal of Comparative Pathology*, 114, 11-21.
- Nakamura, K., Mitral, Y., Yoshioka, M., Koizumi, N., Shibahara, T. & Nakajima, Y. (1998). Serum levels of interleukin-6, α1-acid glycoprotein, and corticosterone in two-week-old chickens inoculated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Poultry Science*, 77, 908-911.
- Nazifi, S., Nabinejad, A., Sepehrimanesh, M., Poorbaghi, S. L., Farshneshani, F. & Rahsepar, M. (2008). Haematology and serum biochemistry of golden eagle (*Aquila chrysaetos*) in Iran. *Comp Clin Pathol*, 17, 197-201.
- Nazifi, S., Tabande, M. R., Hosseinian, S. A., Ansari-Lari, M. & Safari, H. (2009a). Evaluation of sialic acid and acute-phase proteins (haptoglobin and serum amyloids A) in healthy and avian infection bronchitis virus-infected chicks. *Comparative Clinical Pathology*, 20, 69-73.
- Nazifi, S., Dadras, H., Hoseinian, S. A., Ansari-Lari, M. & Masoudian, M. (2009b). Measuring acute phase proteins (haptoglobin, ceruloplasmin, serum amyloid A, and fibrinogen)

in healthy and infectious bursal disease virus-infected chicks. *Comparative Clinical Pathology*, 19, 283-286.

Nielsen, O. L., Jensenius, J. C., Jørgensen, P. H. & Laursen, S. B. (1999). Serum levels of chicken mannan-binding lectin (MBL) during virus infections; indication that chicken MBL is an acute phase reactant. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 70, 309-316.

Nielsen, O. L., Jørgensen, P. H., Hedemand, J., Jensenius, J. C., Koch, C. & Laursen, S. B. (1998). Immunohistochemical investigation of the tissue distribution of mannan-binding lectin in non-infected and virus-infected chickens. *Immunology*, 94, 122-128.

Ocaña, E. N. (2012). Fichas de Aves del Parque Natural "Sierra de Baza" - El Buitre Leonado. Acedido em Agosto 13, 2012, disponível em: http://www.sierradebaza.org/Fichas_fauna/00_Aves/12-01_buitre/buitre.htm

Ordonneau, D., Roman, Y. & Chaste-Duvernoy, D. (2005). Plasma electrophoresis reference ranges in various bird species. In T. Bailey, J. Chitty, N. Harcourt-Brown, & J. Samour (Eds.), *Proceedings of the 8th European Association of Avian Veterinarians Conference and 6th Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting*, Arles, 24th - 30th April 2005, pp. 283-289.

Pendl, H. & Samour, J. (2009). Avian hematology. In A. Martel, T. Bailey, J. Chitty, N. Harcourt-Brown, J. M. Hatt, & M. Jone (Eds.), *Proceedings of the 10th European Association of Avian Veterinarians Conference and 8th Scientific European College of Avian Medicine and Surgery Meeting*, Antwerp, 17th – 21st March 2009, pp. 513-523.

Pendl, H. (2011). Avian and reptilian haematology. In J. Samour, & A. Montesinos (Eds.), *Proceedings of the 11th European Association of Avian Veterinarians Conference and 1st Scientific European Collage of Zoological Medicine Meeting*, Madrid, 26th – 30th April 2011, pp. 550-564.

Petersen, H. H., Nielsen, J. P. & Heegaard, P. M. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35, 163-187.

Plana, M. (2012). Buitre leonado (*Gyps fulvus*). Acedido em Agosto 13, 2012, disponível em: <http://www.faunaiberica.org/?page=buitre-leonado>

Polat, U., Cetin, M., Ak, I. & Balci, F. (2004). Detection of serum protein fractions and their concentrations in laying and non-laying ostriches (*Struthio camelus*) fed with different dietary protein levels. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 155(11), 570-574.

Polo, F. J., Celadrán, J. F., Peinado, V. I., Viscor, G. & Palomeque, J. (1992). Hematological values for four species of birds of prey. *The Condor*, 94, 1007-1013.

Power, D. M., Elias, N. P., Richardson, S. J., Mendes, J., Soares, C. M. & Santos, C. R. (2000). Evolution of the thyroid hormone-binding protein, transthyretin. *General and Comparative Endocrinology*, 119, 241-255.

- Prinsen, B. H. & de Sain-van der Velden, M. G. (2004). Albumin turnover: experimental approach and its application in health and renal diseases. *Clinica Chimica Acta*, 347, 1-14.
- Priorimancha (2012). Buitre negro *Aegypius monachus*. Acedido em Agosto 12, 2012, disponível em: <http://www.priorimancha.es/buitrenegro.html>
- R Development Core Team. (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.r-project.org/>.
- Ratcliffe, M. J. (2006). Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Developmental and Comparative Immunology*, 30, 101-118.
- Righetti, P. & Drysdale, J. W. (1971). Isoelectric focusing in polyacrylamide gels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 236(1), 17-28.
- Roman, Y., Bomsel-Demontoy, M.-C., Levrier, J., Chaste-Duvernoy, D. & Saint Jalme, M. (2009a). Effect of hemolysis on plasma protein levels and plasma electrophoresis in birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(1), 73-80.
- Roman, Y., Bomsel-Demontoy, M.-C., Levrier, J., Ordonneau, D., Chaste-Duvernoy, D. & Saint Jalme, M. (2009b). Influence of molt on plasma protein electrophoretic patterns in bar-headed geese (*Anser indicus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 45(3), 661-671.
- Rosenthal, K. L. (2000). Avian protein disorders. In A. M. Fudge 8Ed.), *Laboratory medicine: avian and exotic pets*. (pp. 171-73). Philadelphia: W. B. Saunders Company.
- Santos, M. D., Yasuike, M., Hirono, I. & Aoki, T. (2006). The granulocyte colony-stimulating factors (CSF3s) of fish and chicken. *Immunogenetics*, 58, 422-432.
- Sijben, J. W., Schrama, J. W., Parmentier, H. K., van der Poel, J. J. & Klasing, K. C. (2001). Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on in vivo splenic cytokine mRNA expression in layer chicks immunized with *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide. *Poultry Science*, 80, 1164-1170.
- Smith, P. K., Krohn, R. L., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.
- Sohail, M. U., Ijaz, A., Yousaf, M. S., Ashraf, K., Zaneb, H., Aleem, M. & Rehman, H. (2010). Alleviation of cyclic heat stress in broilers by dietary supplementation of mannan-oligosaccharide and *Lactobacillus*-based probiotic: Dynamics of cortisol, thyroid hormones, cholesterol, C-reactive protein, and humoral immunity. *Poultry Science*, 89, 1934-1938.
- Spagnolo, V., Crippa, V., Marzia, A. & Sartorell, P. (2006). Reference intervals for hematologic and biochemical constituents and protein electrophoretic fractions in captive common buzzards (*Buteo buteo*). *Veterinary Clinical Pathology*, 35(1), 82-87.

- Springer, W. T., Luskus, C. & Pourciau, S. S. (1977). Infectious bronchitis and mixed infectious of *Mycoplasma synoviae* and *Escherichia coli* in genotobiotic chickens synergistic role in the airsacculitis syndrome. *Infection and Immunity*, 10, 578-589.
- Stred, S. E., Cote, D., Weinstock, R. S. & Messina, J. L. (2003). Regulation of hemopexin transcription by calcium ionophores and phorbol ester in hepatoma cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 204, 111-116.
- Suffredini, A. F., Fantuzzi, G., Badolato, R., Oppenheim, J. J. & O'Grady, N. P. (1999). New insights into the biology of the acute phase response. *Journal of Clinical Immunology*, 19(4), 203-214.
- Sunde, M., Richardson, S. J., Chang, L., Pettersson, T. M., Schreiber, G. & Blake, C. C. (1996). The crystal structure of transthyretin from chicken. *European Journal of Biochemistry*, 236, 491-499.
- Sutton, R. H. (1976). The refractometric determination of the total protein concentration in some animal plasmas. *New Zealand Veterinary Journal*, 24, 141-148.
- Takahashi, K., Aoki, A., Takimoto, T. & Akiba, Y. (2008). Dietary supplementation of glycine modulates inflammatory response indicators in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, 100, 1019-1028.
- Takahashi, K., Miyake, N., Ohta, T., Akiba, Y. & Tamura, K. (1998). Changes in plasma α 1-acid glycoprotein concentration and selected immune response in broiler chickens injected with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *British Poultry Science*, 39, 152-155.
- Takahashi, K., Ohta, N. & Akiba, Y. (1997). Influences of dietary methionine and cysteine on metabolic responses to immunological stress by *Escherichia coli* lipopolysaccharide injection, and mitogenic response in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, 78, 815-821.
- Tatum, L. M., Zaias, J., Mealey, B. K., Cray, C. & Bossart, G. D. (2000). Protein electrophoresis as a diagnostic and prognostic tool in raptor medicine. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31(4), 497-502.
- Tegla, C. A., Cudrici, C., Patel, S., Trippe III, R., Rus, V., Niculescu, F. & Rus, H. (2011). Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunologic research*, 51, 45-60.
- Tohjo, H., Yadatsu, M., Uchida, E., Niiyama, M., Syuto, B., Moritsu, Y., Ichikawa, S. & Takeuchi, M. (1996). Polyacrilamide gel electrophoretic serum protein patterns of acute inflammation induced by intramuscular injection of turpentine in young broiler chickens. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58(3), 267-268.
- Toussaint, M. J., van Ederen, A. M. & Gruys, E. (1995). Implication of clinical pathology in assessment of animal health and in animal production and meat inspection. *Comparative Haematology International*, 5, 149-157.

- Trumel, C., Schelcher, F., Braun, J. P. & Guelfi, J. F. (1996). Serum protein electrophoresis: guidelines for diagnosis evaluation in the dog, cat, and horse. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 147, 123-130.
- Tsujinaka, T., Ebisui, C., Fujita, J., Kishibuchi, M., Morimoto, T., Ogawa, A., Katsume, A., Ohsugi, Y., Kominami, E. & Monden, M. (1995). Muscle undergoes atrophy in association with increase of lysosomal cathepsin activity in interleukin-6 transgenic mouse. *Biochemical and Biophysical research communications*, 207(1), 168-174.
- Upragarin, N., Landman, W. J., Gastra, W. & Gruys, E. (2005a). Extrahepatic production of acute phase serum amyloid A. *Histology and Histopathology*, 20, 1295-1307.
- Upragarin, N., Van Asten, A. J., Tooten, P. C., Landman, W. J. & Gruys, E. (2005b). Serum amyloid A production by chicken fibroblast-like synoviocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106, 39-51.
- van Miert, A. (1995). Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: Pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects. *Veterinary Quarterly*, 17, 41-50.
- van Wyk, E., van der Bank, H. & Verdoorn, G. H. (1998). Dynamics of haematology and blood biochemistry in free-living african whitebacked vulture (*Pseudogyps africanus*) nestlings. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 120, 495-508.
- Villegas, A., Sánchez, J. M., Costillo, E. & Corbacho, C. (2002). Blood chemistry and haematocrit of the black vulture (*Aegypius monachus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 132, 489-497.
- Warr, G. W., Magor, K. E. & Higgins, D. A. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology today*, 16(8), 392-398.
- Watterson, C. L. (2009). Proteins. In G. O. Evans (Ed.), *Animal clinical chemistry - A practical guide for toxicologists and biomedical researchers* (2nd ed.). (pp. 159-81). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Weiser, G. (2004). Sample collection, processing, and analysis of laboratory service options. In M. A. Thrall, D. C. Baker, T. W. Campbell, D. DeNicola, M. J. Fettman, E. D. Lassen, A. Rebar & G. Weiser (Eds.), *Veterinary hematology and clinical chemistry*. (pp. 39-44). Iowa: Blackwell Publishing.
- Wieland, W. H., Orzáez, D., Lammers, A., Parmentier, H. K., Verstegen, M. W. & Schots, A. (2004). A functional polymeric immunoglobulin receptor in chicken (*Gallus gallus*) indicates ancient role of secretory IgA in mucosal immunity. *Biochemical Journal*, 380, 669-676.
- Witlock, D. R. (1978). Effects of *Eimeria tenella* infection and dietary aflatoxin on blood coagulation of young broiler chicks. *Avian Diseases*, 22, 481-486.
- Xie, H., Rath, N. C., Huff, G. R., Huff, W. E. & Balog, J. M. (2000). Effects of *Salmonella typhimurium* lipopolysaccharide on broiler chickens. *Poultry Science*, 79, 33-40.

- Xie, H., Rath, N. C., Huff, G. R., Balog, J. M. & Huff, W. E. (2001). Inflammation-induced changes in serum modulate chicken macrophage function. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 80, 225-235.
- Xie, H., Newberry, L., Clark, F. D., Huff, W. E., Huff, G. R., Balog, J. M. & Rath, N. C. (2002a). Changes in serum ovotransferrin levels in chickens with experimentally induced inflammation and diseases [abstract]. *Avian Diseases*, 46(1), 122-131.
- Xie, H., Huff, G. R., Huff, W. E., Balog, J. M. & Rath, N. C. (2002b). Effects of ovotransferrin on chicken macrophages and heterophil-granulocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 26, 805-815.
- Xie, H., Huff, G. R., Huff, W. E., Balog, J. M., Holt, P. & Rath, N. C. (2002c). Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens. *Poultry Science*, 81, 112-120.
- Yang, F., Haile, D. J., Berger, F. G., Herbert, D. C., Van Beveren, E. & Ghio, A. J. (2002). Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284, L402-L409.
- Zanotti, G., Calderone, V., Beda, M., Malpeli, G., Folli, C. & Berni, R. (2001). Structure of chicken plasma retinol-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1550, 64-69.
- Zsila, F., Matsunaga, H., Bikádi, Z. & Haginaka, J. (2006). Multiple ligand-binding properties of the lipocalin member chicken α 1-acid glycoprotein studied by circular dichroism and electronic absorption spectroscopy: the essential role of the conserved tryptophan residue. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760, 1248-1273.

ANEXO I – Características da espécie abutre-preto (*Aegypius monachus*)

Tabela 6. Características da espécie abutre-preto (*Aegypius monachus*)

| Característica em estudo | Valor |
|-------------------------------|------------------|
| Longitude | 98 – 107 cm |
| Envergadura alar | 250 – 300 cm |
| Peso de um exemplar adulto | Até 10 kg |
| Maturidade sexual | 4 – 6 anos |
| Longevidade máxima registada | 40 anos |
| Início da época de reprodução | Janeiro |
| Época de incubação | Fevereiro - Maio |
| Época das crias nos ninhos | Abril a Novembro |
| Número de ovos | 1 |
| Número de posturas | Uma anual |
| Duração da Incubação | 50 – 55 dias |
| Período de crias nos ninhos | 120 dias |
| Número de crias | 1 |

ANEXO II – Características da espécie grifo (*Gyps fulvus*)

Tabela 7. Características da espécie grifo (*Gyps fulvus*)

| Característica em estudo | Valor |
|-------------------------------|--------------------|
| Longitude | 95 – 105 cm |
| Envergadura alar | 240 – 280 cm |
| Peso de um exemplar adulto | 7 – 11 kg |
| Maturidade sexual | 4 – 5 anos |
| Longevidade máxima registada | 55 anos |
| Início da época de reprodução | Dezembro |
| Época de incubação | Dezembro - Março |
| Época das crias nos ninhos | Fevereiro - Agosto |
| Número de ovos | 1 |
| Número de posturas | Uma anual |
| Duração da Incubação | 47 – 57 dias |
| Período de crias nos ninhos | 113 – 159 dias |
| Número de crias | 1 |

ANEXO III – Estudos anteriores realizados em aves

Tabela 8. Valores de proteínas totais e frações proteicas obtidos em outros estudos realizados em aves

| Espécie | n | PT g/dL | Pré- albumina g/dL | Albumina g/dL (%) | α1-globulinas g/dL (%) | α2-globulinas g/dL (%) | β-globulinas g/dL (%) | γ-globulinas g/dL (%) | A/G | Autores |
|--|----|-------------|--------------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------------------------|
| Abutre-preto (<i>Aegypius monachus</i>) | | | | | | | | | | |
| Crias selvagens | 57 | 2,9± 0,4 | | | | | | | | Villegas <i>et al.</i> (2002) |
| Juvenis de cativo | 7 | 3,9± 0,7 | - | - | - | - | - | - | - | |
| Adultos selvagens | 5 | 3,5± 0,4 | | | | | | | | |
| Adultos de cativo | 4 | 2,2± 1,0 | | | | | | | | |
| Grifo (<i>Gyps fulvus</i>) | 7 | 3,9± 0,8 | 0,17 ± 0,24 (-) | 1,77±0,4 (-) | 0,83 ± 0,25 (-) | | 1,17 ± 0,4 (-) | 0,58 ± 0,34 (-) | 0,76 ± 0,29 | Polo <i>et al.</i> (1992) |
| Grifo (<i>Gyps Fulvus</i>) | 6 | 2,9± 0,6 | - (7,2 ± 0,9) | - (30,6± 3,2) | - (12,2 ± 2,8) | - (7,1 ± 1,2) | - (29,5 ± 6,8) | - (13,8 ± 2,3) | - | Balasch <i>et al.</i> (1976) |

| Tabela 8 (Continuação) | | | | | | | | | | |
|---|----|-------------|---------------------------|------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------|----------------------------------|
| Águia-de-cabeça-branca (<i>Haliaeetus leucocephalus</i>) | 46 | 3,5± 0,5 | 0,14 ± 0,1 (4 ± 3) | 1,6 ± 0,2 (45 ± 6) | 0,43 ± 0,2 (12 ± 6) | 0,49 ± 0,2 (13 ± 3) | 0,54 ± 0,2 (15 ± 3) | 0,34 ± 0,1 (10 ± 3) | 1,0± 0,3 | Tatum <i>et al.</i> (2000) |
| Búteo-de-cauda-vermelha (<i>Buteo jamaicensis</i>) | 20 | 4,6± 1,0 | 0,17 ± 0,3 (4 ± 8) | 2,2 ± 0,5 (49 ± 9) | 0,29 ± 0,2 (5 ± 4) | 0,66 ± 0,1 (14 ± 3) | 0,77 ± 0,3 (17 ± 3) | 0,48 ± 0,4 (10 ± 6) | 1,2± 0,3 | Tatum <i>et al.</i> (2000) |
| Urubu-de-cabeça-vermelha (<i>Cathartes aura</i>) | 11 | 4,4± 0,7 | 0,04 ± 0,08 (1 ± 2) | 2,3 ± 0,4 (51 ± 5) | 0,37 ± 0,1 (8 ± 2) | 0,58 ± 0,1 (14 ± 2) | 0,52 ± 0,2 (13 ± 2) | 0,59 ± 0,2 (15 ± 5) | 1,2± 0,4 | Tatum <i>et al.</i> (2000) |
| Águia-marinha-de-Steller (<i>Haliaeetus pelagicus</i>) | 9 | 3,7± 0,6 | 0,09 ± 0,1 (2 ± 2) | 1,4 ± 0,2 (39 ± 4) | 0,68 ± 0,1 (19 ± 4) | 0,58 ± 0,2 (16 ± 3) | 0,59 ± 0,2 (16 ± 4) | 0,31 ± 0,1 (9 ± 3) | 0,7± 0,1 | Tatum <i>et al.</i> (2000) |
| Águia de Harris (<i>Parabuteo unicinctus</i>) | 9 | 3,7± 0,5 | 0,08 ± 0,1 (1 ± 2) | 2,0 ± 0,4 (54 ± 9) | 0,51 ± 0,4 (15 ± 8) | 0,51 ± 0,1 (13 ± 2) | 0,43 ± 0,1 (12 ± 3) | 0,17 ± 0,1 (4 ± 2) | 1,4± 0,6 | Tatum <i>et al.</i> (2000) |
| Urubu-de-cabeça-preta (<i>Coragyps atratus</i>) | 7 | 3,7± 0,6 | 0,6 ± 0,1 (2 ± 3) | 1,9 ± 0,2 (51 ± 5) | 0,29 ± 0,1 (7 ± 3) | 0,45 ± 0,2 (15 ± 5) | 0,68 ± 0,3 (16 ± 5) | 0,36 ± 0,2 (9 ± 5) | 1,1± 0,3 | Tatum <i>et al.</i> (2000) |
| Águia-de-asa-redonda (<i>Buteo buteo</i>) | 40 | 3,8± 0,6 | 0,15 ± 0,17 (-) | 1,52±0,2 (-) | 0,59 ± 0,12 (-) | 0,47 ± 0,23 (-) | 0,75 ± 0,16 (-) | 0,37 ± 0,17 (-) | 0,8± 0,18 | Gelli <i>et al.</i> (2009) |
| Águia-de-asa-redonda (<i>Buteo buteo</i>) | 23 | 4,7± 1,7 | 0,72 ± 0,34 (14,8±4,8) | 1,4±0,42 (29,2±5,9) | 0,65 ± 0,26 (13,2 ± 3,9) | 0,57 ± 0,27 (11,3 ± 2,6) | 1,09 ± 0,35 (22,2 ± 3,6) | 0,46 ± 0,23 (9,3 ± 4,0) | 0,7± 0,2 | Spagnolo <i>et al.</i> (2006) |

| Tabela 8 (Continuação) | | | | | | | | | | |
|---|-----|-------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Milhafre-preto (<i>Milvus migrans</i>) | 34 | 4,0± 0,3 | - | 1,7±0,25 (44 ± 4) | 0,29 ± 0,13 (7 ± 3) | 1,03 ± 0,23 (26 ± 6) | 0,62 ± 0,16 (15 ± 3) | 0,31 ± 0,09 (8 ± 2) | 0,8± 0,1 | Ordonneau <i>et al.</i> (2005) |
| Falcão-peregrino (<i>Falco peregrinus</i>) | 32 | 3,8± 0,2 | 0,31 ± 0,04 (8 ± 1) | 1,25±0,1 (34 ± 1) | 0,23 ± 0,02 (6 ± 0,7) | 0,16 ± 0,02 (4 ± 0,4) | 1,02 ± 0,05 (28 ± 0,8) | 0,60 ± 0,08 (16 ± 1,2) | 0,8± 0,03 | Lanzarot <i>et al.</i> (2001) |
| Papagaio cinzento (<i>Psittacus erithacus</i>) | 139 | 3,0- 4,6 | 0 – 1,25 (0 – 13) | 1,48- 3,19 (50 - 69) | 0,03 – 0,19 (2 – 7) | 0,05 – 0,21 (3 – 7) | 0,35 – 0,64 (15 – 25) | 0,12 – 0,68 (4 – 13) | 1,3- 2,7 | Cray <i>et al.</i> (2007) |
| Periquito-comum (<i>Melopsittacus undulatus</i>) | 50 | 2,4- 4,6 | 0,48 – 1,21 (17 - 25) | 0,79- 1,35 (20 - 32) | 0,08 – 0,21 (3 - 6) | 0,05 – 0,16 (3 - 6) | 0,35 – 0,72 (9 - 19) | 0,18 – 0,51 (5 - 10) | 1,5- 2,7 | Cray <i>et al.</i> (2007) |
| Caturra (<i>Nymphicus hollandicus</i>) | 62 | 2,4- 4,2 | 0,85 – 1,65 (24 - 34) | 0,75- 1,85 (31 - 40) | 0,05 – 0,24 (2 - 4) | 0,05 – 0,22 (2 - 6) | 0,31 – 0,68 (12 – 24) | 0,15 – 0,53 (3 - 14) | 1,5- 2,9 | Cray <i>et al.</i> (2007) |
| Papagaio Jardim (<i>Poicephalus gularis</i>) | 50 | 2,8- 4,4 | 0,18 – 0,45 (5 - 23) | 1,77- 2,38 (39 - 58) | 0,05 – 0,16 (2 - 6) | 0,05 – 0,22 (2 - 6) | 0,38 – 0,69 (11 - 18) | 0,26 – 0,59 (7 - 14) | 1,5- 3,2 | Cray <i>et al.</i> (2007) |
| Maitaca-verde (<i>Pionus maximiliani</i>) | 50 | 2,2- 4,4 | 0,19 – 0,93 (8 - 33) | 1,89- 3,09 (39 - 61) | 0,05 – 0,19 (2 - 5) | 0,06 – 0,20 (2 - 6) | 0,28 – 0,60 (11 - 22) | 0,18 – 0,58 (5 - 9) | 1,9- 3,3 | Cray <i>et al.</i> (2007) |

ANEXO IV – Valores hematológicos obtidos para amostra de abutres-pretos

Tabela 9. Valores hematológicos obtidos para a amostra de abutres-pretos

| Parâmetros | Unidades | n | $\bar{x} \pm \sigma$ | Mínimo - Máximo |
|----------------------|-----------------------------|----------|--|------------------------|
| Hematológicos | | | | |
| Hematócrito | % | 10 | 35,3 ± 5,00 | 26,90 ± 41,20 |
| TRBC | x10 ⁶ células/μl | 10 | 2,2 ± 0,32 | 1,47 – 2,59 |
| TWBC | x10 ³ células/μl | 10 | 8,9 ± 3,61 | 4,20 – 15,00 |
| Heterófilos | x10 ³ células/μl | 10 | 6,3 ± 2,81 | 2,94 – 12,00 |
| Eosinófilos | x10 ³ células/μl | 10 | 0,4 ± 1,10 | 0 – 3,54 |
| Basófilos | x10 ³ células/μl | 10 | 0,1 ± 0,16 | 0 – 0,52 |
| Linfócitos | x10 ³ células/μl | 10 | 1,6 ± 0,45 | 0,99 – 2,40 |
| Monócitos | x10 ³ células/μl | 10 | 0,5 ± 0,54 | 0,13 – 1,97 |

ANEXO V – Valores hematológicos obtidos para amostra de grifos

Tabela 10. Valores hematológicos obtidos para a amostra de grifos

| Parâmetros | Unidades | n | $\bar{x} \pm \sigma$ | Mínimo - Máximo |
|----------------------|-----------------------------|----------|--|------------------------|
| Hematológicos | | | | |
| Hematócrito | % | 11 | 42,7 ± 3,77 | 36,00 – 48,00 |
| TRBC | x10 ⁶ células/μl | 11 | 2,1 ± 0,54 | 1,45 – 3,12 |
| TWBC | x10 ³ células/μl | 11 | 12,3 ± 4,09 | 5,28 – 18,50 |
| Heterófilos | x10 ³ células/μl | 11 | 9,0 ± 3,32 | 4,01 – 15,91 |
| Eosinófilos | x10 ³ células/μl | 11 | 0,6 ± 0,61 | 0 – 1,88 |
| Basófilos | x10 ³ células/μl | 11 | 0,1 ± 0,20 | 0 – 0,51 |
| Linfócitos | x10 ³ células/μl | 11 | 2,0 ± 1,35 | 0,42 – 4,08 |
| Monócitos | x10 ³ células/μl | 11 | 0,5 ± 0,36 | 0 – 1,19 |

ANEXO VI – Valores bioquímicos obtidos para a amostra de abutres-pretos

Tabela 11. Valores bioquímicos obtidos para a amostra de abutres-pretos

| Parâmetros | Unidades | n | $\bar{x} \pm \sigma$ | Mínimo - Máximo |
|-------------------------------------|-----------------|----------|--|------------------------|
| Hematológicos | | | | |
| Ácido úrico | mg/L | 10 | 2,5 ± 0,66 | 1,14 – 3,20 |
| Ureia | mg/dL | 10 | 2,9 ± 0,72 | 1,70 – 4,00 |
| AST | U/L | 10 | 199,4 ± 64,45 | 102,00 – 288,00 |
| ALT | U/L | 10 | 47,4 ± 33,35 | 9,00 – 100,00 |
| LDH | U/L | 10 | 902,9 ± 126,29 | 754,00 – 1091,00 |
| GGT | U/L | 10 | 1,9 ± 0,82 | 1,00 – 3,00 |
| CK | U/L | 10 | 416,2 ± 219,34 | 72,00 – 734,00 |
| Ácidos biliares | μmol/L | 10 | 9,7 ± 3,06 | 3,00 – 14,00 |
| Colesterol | mg/dL | 10 | 226,9 ± 38,38 | 172,00 – 270,00 |
| Amílase | U/L | 10 | 1233,0 ± 456,00 | 390,00 – 1960,00 |
| Glucose | mg/dL | 10 | 242,3 ± 34,99 | 203,00 – 317,00 |
| Potássio | mmol/L | 10 | 3,3 ± 0,74 | 2,10 – 4,30 |
| Sódio | mmol/L | 10 | 157,2 ± 6,39 | 146,00 – 166,00 |
| Cálcio | mg/dL | 10 | 10,0 ± 0,77 | 8,70 – 11,50 |
| Fósforo | mg/dL | 10 | 4,5 ± 1,13 | 2,30 – 6,20 |
| Proteínas totais[#] | g/dL | 10 | 4,6 ± 0,53 | 3,60 – 5,20 |

- Método do biureto

ANEXO VII – Solução descolorante

Seguidamente serão indicados os constituintes da solução descolorante e respectivas quantidades:

| | |
|--|---------|
| Ácido acético (CH_3COOH) | 5 mL |
| Metanol (CH_3OH) | 47,5 mL |
| Água destilada (H_2O) | 47,5 mL |